

Aus dem Friedrich-Baur-Institut der Medizinischen Fakultät
an der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktorin: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich)



Molekulargenetische Analyse der Kandidatengene *p97/VCP*, Myotilin und Vimentin bei hereditären Myopathien

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Barbara Doris Zehetmayer

aus

München

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Tim M. Strom
Prof. Dr. Elke Holinski-Feder

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2015

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Reilich, P., Krause, S., Schramm, N., Klutzny, U., Bulst, S., Zehetmayer, B., Schneiderat, P., Walter, M. C., Schoser, B., Lochmüller, H. (2011) **A novel mutation in the myotilin gene (*MYOT*) causes a severe form of limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A).** J Neurol. 258(8):1437-44.

Inhaltsverzeichnis		
1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	GRUNDLAGEN	3
2.1	IBMPFD (EINSCHLUSSKÖRPERMYOPATHIE, MORBUS PAGET UND FRONTOTEMPORALE DEMENZ)	5
2.1.1	Einschlusskörpermyopathie	8
2.1.2	Morbus Paget	12
2.1.3	Frontotemporale Demenz	14
2.1.4	Therapie	15
2.2	MYOTILINOPATHIEN	16
2.3	VIMENTIN ALS MÖGLICHES KANDIDATENGEN FÜR MYOFIBRILLÄRE MYOPATHIEN	18
2.4	DIFFERENZIALDIAGNOSEN	19
2.4.1	Primäre Desminopathie (Ehemals HIBM1)	19
2.4.2	GNE-Myopathie (HIBM2) – autosomal-rezessiv	20
2.4.3	Erbliche Myosin-Myopathien (ehemals HIBM3)	20
2.4.4	Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD)	21
2.4.5	Weitere hereditäre Myopathien und neurodegenerative Erkrankungen	21
3	ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG	23
4	MATERIALIEN UND METHODEN	25
4.1	PATIENTEN UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL	25
4.2	CHEMIKALIEN	25
4.3	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN	25
4.3.1	DNA Extraktion	25
4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
4.3.3	Aufreinigung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese	27
4.3.4	Gelextraktion	28
4.3.5	Direkte Sequenzanalyse	28
4.3.6	Restriktionsverdau und RFLP-Analyse	28
4.3.7	Mutagenese der Position VCP R159C im Exon 5 des VCP-Gens	29
4.3.8	Klonierung – Einführung der Mutation VCP R159C in den Vektor pTH333	30
4.3.9	Transfektion in PMI28-Zellen	31
4.3.10	Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie	31
4.3.11	Primer	32
5	ERGEBNISSE	34
5.1	ANALYSE DES VCP-GENS	35
5.1.1	Klinische Analyse und Vergleich zweier Patienten mit der Mutation R159C	35
5.1.2	Histopathologische Analyse	38
5.1.3	Molekulargenetische Analyse	40
5.1.4	Funktionelle Analyse der Mutation R159C im VCP-Gen	43
5.2	ANALYSE DES VIMENTIN-GENS	49
5.3	ANALYSE DES MYOTILIN-GENS	52
5.3.1	Klinische Charakterisierung	52
5.3.2	Histopathologische Analyse	53
5.3.3	Molekulargenetische Analyse	54
6	DISKUSSION	55

6.1	MUTATIONEN IM <i>VCP</i> -GEN	55
6.1.1	<i>Die Mutation an Position R159C</i>	57
6.2	MUTATIONEN IM MYOTILIN-GEN	59
6.3	ANALYSE DES KANDIDATEN-GENS VIMENTIN	61
6.4	BEDEUTUNG DER GENETISCHEN DIAGNOSTIK UND AUSBLICK	62
7	LITERATURVERZEICHNIS	63
	DANKSAGUNG	72
	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	73
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	74

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosintriphosphat
CD4/CD8	Cluster of differentiation 4/8
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CK	Kreatinkinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DYS	Dystrophin-Gen
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EKG	Elektrokardiographie
ERAD	Proteinabbau im Endoplasmatischen Retikulum (endoplasmic reticulum associated degradation)
FCS	Fetales Kälberserum
FKRP	Fukutin-related protein
FSHD	Faszioskapulohumerale Dystrophie
FTD	Frontotemporale Demenz
FTDL-FUS	Frontotemporallappen-Degeneration mit FUS-positiven Einschlüssen
FTDL-tau	Frontotemporallappen-Degeneration mit tau-positiven Einschlüssen
FTDL-TDP	Frontotemporallappen-Degeneration mit TDP-43-positiven Einschlüssen
FUS	Fused in Sarcoma (RNA-binding protein)
GNE	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase N-acetylmannosamine kinase
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hIBM	hereditary inclusion body myopathy, erbliche Einschlusskörpermyopathie
IBMPFD	Inclusion body myopathy with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
LB	Luria-Bertani
LGMD	Limb Girdle Muscular Dystrophy, Gliedergürtelmuskeldystrophie
M.	Morbus
M.	Musculus
MFM	Myofibrilläre Myopathie

MMST	Mini-Mental-Status-Test
MRT	Magnetresonanztomographie
MYOT	Myotilin
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Paget's disease of bone/ M. Paget
PFA	Paraformaldehyd
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
s-IBM	sporadic inclusion body myopathy, sporadische Einschlusskörpermyopathie
SMA	Spinale Muskelatrophie
SPIR	Spectral Presaturation with Inversion Recovery – Fettunterdrückende MRT-Sequenz
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TDP-43	Tar-DNA-binding protein
T _m	Schmelztemperatur (melting temperature)
u. a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
v. a.	vor allem
VCP	Valosin containing protein
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Gruppe der degenerativen Myopathien mit Proteinaggregaten und myofibrillären Veränderungen ist eine genetisch und klinisch heterogene Gruppe der erblichen Muskelerkrankungen. In der folgenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf zwei spezielle Erkrankungen gelegt. Dabei handelte es sich um die IBMPFD (Inclusion body myopathy, Paget's disease of bone and frontotemporal dementia – Einschlusskörpermyopathie mit Morbus Paget und frontotemporaler Demenz) und eine Form der Gliedergürteldystrophie (LGMD1A-Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A). Beides sind Erkrankungen des Erwachsenenalters und eher durch eine langsame Progredienz gekennzeichnet.

Ziel der Arbeit war eine klinische Charakterisierung von betroffenen Patienten mit genauer molekulargenetischer Analyse der drei Kandidatengene VCP/p97 (*VCP*), Myotilin (*MYOT*) und Vimentin (*VIM*). Hierzu wurde bei der Verdachtsdiagnose einer degenerativen Myopathie oder Einschlusskörpermyopathie die Patienten-DNA auf mögliche krankheitsauslösende Mutationen untersucht. Des Weiteren folgten klinische Vergleiche des Phänotyps bestimmter Mutationen und spezifischere zellbiologische Untersuchungen zum besseren Verständnis der Pathogenese der Erkrankungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die genomische DNA von insgesamt 42 Patienten molekulargenetisch untersucht. Bei zwei Patienten wurde dabei die seltene Mutation R159C im *VCP*-Gen identifiziert, die klinisch zum Phänotyp einer IBMPFD passte, welche weiters in funktionellen Analysen im Zellkulturmodell untersucht wurde. Hierbei zeigte sich eine Störung der Myofibrillenbildung und Zelldifferenzierung.

Bei der dominanten Gliedergürteldystrophie LGMD1A konnte ein krankheitsassoziierter Basenaustausch im *MYOT*-Gen neu identifiziert werden, der mit der Erkrankung innerhalb der betroffenen Familie segregierte. In Kontrollpopulationen ohne neuromuskuläre Erkrankungen wurde diese Genvariante nicht nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Pathogenität der Mutation durch die phylogenetische Konservierung der entsprechenden Aminosäureposition und bioinformatische Vorhersage-Algorithmen gestützt.

Zur Identifizierung weiterer genetischer Ursachen hereditärer Einschlusskörpermyopathien wurde das Kandidatengen Vimentin mittels direkter Sequenzierung bei einem Patientenkollektiv von 28 Patienten mit einer Aggregatmyopathie unklarer Genese untersucht. Das Protein Vimentin ist ein Typ-3-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine. Sein Vorkommen in pathologischen Proteinablagerungen bei myofibrillären Myopathien legte einen Zusammenhang mit anderen Proteinaggregatmyopathien nahe, so dass es als interessantes neues Kandidatengen

erschien. Hier fand sich jedoch kein Hinweis darauf, dass Mutationen im Vimentin-Gen eine häufige Ursache für Aggregatmyopathien in dem untersuchten Patientenkollektiv sind.

Für Patienten mit einer erblichen Aggregatmyopathie ist eine genaue genetische Diagnostik eine wichtige Information, da sie bei der Klassifikation der Erkrankung hilfreich ist, Aussagen über die Prognose vereinfacht und auch weiterführende, interdisziplinäre Diagnostik begründet. Zusätzlich hat eine genetische Erkrankung auch Auswirkungen auf die Familienplanung, sodass der sorgfältigen Diagnosestellung eine professionelle humangenetische Beratung folgen sollte.

Derzeit beschränkt sich die Therapie der in dieser Arbeit behandelten Erkrankungen überwiegend auf supportive Maßnahmen. In Zukunft sind aber auch spezifische Gentherapien vorstellbar, die eine präzise genetische Diagnostik als Basis benötigen. Bei einer Vielzahl von bisher unheilbaren, degenerativen neuromuskulären Erkrankungen bildet eine konsequente intensive Forschung auf molekular- und zellbiologischer Ebene die Grundlage neuer translationaler Forschungsansätze für künftige kausale Therapieoptionen.

2 GRUNDLAGEN

Die erblichen Muskelerkrankungen umfassen eine große Gruppe klinisch und genetisch heterogener neuromuskulärer Krankheitsbilder. Es handelt sich um Erkrankungen, die überwiegend die Skelettmuskulatur befallen. Eine Einteilung kann unter verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen:

- betroffene Gene [z. B. Myotilin (*MYOT*), *GNE*, *VCP*, Dystrophin (*DYS*)]
- befallene Muskelgruppen und Verteilung (z. B. distal, proximal, faziale Beteiligung, Gliedergürtelmuskulatur)
- Lebensalter bei Ausbruch (kongenital, Frühmanifestation, Spätmanifestation)
- muskelpathologische Gemeinsamkeiten (z. B. Einschlusskörperchen, myofibrilläre Veränderungen, pathologische Proteinaggregate)
- Serum-Kreatinkinase (CK)-Spiegel (Kreatinkinase erhöht, normal)
- Beteiligung des Immunsystems (z. B. entzündliche Infiltrate, Nachweis CD8 oder CD4-positiver T-Zellen)

Die erstellten Systematiken unterliegen einem stetigen Wandel, insbesondere aufgrund der ständig wachsenden wissenschaftlichen Erkenntnisse. Die Übersichtstabelle (Abb.1) soll als Orientierungshilfe dienen und dazu beitragen, die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Krankheiten und Gene in einen größeren Zusammenhang einzuordnen.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf zwei spezielle erbliche Erkrankungen gelegt: die IBMPFD (Inclusion body myopathy, Paget's disease of bone and frontotemporal dementia – Einschlusskörpermyopathie mit Morbus Paget und frontotemporaler Demenz) und eine Form der Gliedergürteldystrophie (LGMD1A-Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A), die sich klinisch mitunter stark ähneln können. Sie beginnen im späteren Erwachsenenalter mit progredienter Muskelschwäche und befallen bevorzugt die Gliedergürtelmuskulatur. Bei der IBMPFD kann auch bei Krankheitsbeginn zunächst eine distale Myopathie der unteren Extremität im Vordergrund stehen.

Mutationen im *VCP*- und Myotilin (*MYOT*)-Gen sind bekannte Ursachen für die oben aufgeführten Muskelerkrankungen. Ein möglicher Zusammenhang von Veränderungen im Vimentin-Gen mit hereditären Myopathien wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht.

Erkrankungsname	mutiertes Gen	Genlocus und Vererbung	Muskelpathologie	Klinik
hereditäre Einschlusskörpermyopathien				
hIBM1	Desmin (<i>DES</i>)	2q35, AD	Myopathisch mit Vakuolen	LGMD-Phänotyp, frühe Beteiligung des M. quadriceps kardiale und respiratorische Insuffizienz
GNE-Myopathie	UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase (<i>GNE</i>)	9p13.3, AR	Myopathisch mit Vakuolen	distaler Beginn, Aussparung des M. quadriceps
hIBM3	Myosin heavy chain IIa (<i>MYH2</i>)	17p13.1, AD	Myopathisch mit Vakuolen	Gelenkkontrakturen bei Geburt, langsam progressive Myopathie, Ophthalmoplegie
IBMPFD	Valosin-containing Protein (<i>VCP</i>)	9p13.3, AD	Myopathisch mit Vakuolen	LGMD- oder distaler Phänotyp, M. Paget, frontotemporale Demenz, auch oligosymptomatisch
Muskeldystrophien (MD)				
Duchenne	Dystrophin (<i>DYS</i>)	Xp21.2 X-R	Dystrophin fehlend	Wadenhypertrophie, Watschelgang, Verlust der Gehfähigkeit mit 7-12 Jahren, schwere Herz und Lungenbeteiligung
Becker-Kiener	Dystrophin (<i>DYS</i>)	Xp21.2 X-R	Dystrophin reduziert	Verlauf gutartiger, variable Präsentation mit spätem Beginn und langsamerem Fortschreiten
Gliedergürtelmuskeldystrophie LGMD1A (allelisch mit Myotilinopathie)	Myotilin (<i>MYOT/TTID</i>)	5q31, AD	zahlreiche "rimmed vacuoles" und hyaline Einschlüsse, ggf. erhöhte Myotilin-Anfärbbarkeit	Milder LGMD-Phänotyp mit proximalem Beginn, langsamer Progression mit spätem Verlust der Gehfähigkeit, Dysarthrie nasale Sprache, Kardiomyopathie
Distale Myopathien				
Nonaka Myopathie (allelisch mit hIBM2)	UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin Kinase (<i>GNE</i>)	9p13.3, AR	Myopathisch mit Vakuolen	Beginn im distalen anterioren Kompartiment der Beine
Myofibrilläre Myopathien (MF/M)				
Desminopathien	Desmin (<i>DES</i>)	2q35, AD	Proteinaggregate, autophagische Vakuolen, ultrastrukturell granulofilamentöses Material	distale, LGMD und scapuloperoneale Phänotypen, im Verlauf faziale und pharyngeale Schwäche, Dysarthrie, Kardiomyopathie Ateminsuffizienz
Myotilinopathie (allelisch mit LGMD1A)	Myotilin (<i>MYOT</i>)	5q31, AD	Proteinaggregate, autophagische Vakuolen, ultrastrukturell granulofilamentäres Material	distale, LGMD und scapuloperoneale Phänotypen, im Verlauf faziale und pharyngeale Schwäche, Dysarthrie, Myalgien Kontrakturen, Kardiomyopathie, Ateminsuffizienz

Tab. 1.: Übersicht der erblichen Muskelerkrankungen Die Tabelle gibt einen kurzen Überblick über häufige Myopathien. Besonders hervorgehoben wurden die Erkrankungen, die in dieser Arbeit genauer bearbeitet werden. Modifiziert nach Walter, M.C. und Klopstock T. Muskeldystrophien und andere hereditäre Myopathien . In Brandt, T., Dichgans, J. Diener, H.-C. (Eds.), Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. Stuttgart: Kohlhammer, 2012.

2.1 IBMPFD (Einschlusskörpermyopathie, Morbus Paget und frontotemporale Demenz)

Die IBMPFD (OMIM #167320) ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte neuromuskuläre Erkrankung die im Jahre 2000 erstmals klinisch beschrieben wurde und deren genetische Ursache 2004 identifiziert wurde ([Kimonis et al. 2000](#), [Watts et al. 2004](#)). Neben dem Befall des Skelettmuskels sind häufig auch der Knochen und das Gehirn betroffen. Die Krankheit beginnt meist zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr, die frontotemporale Demenz entwickelt sich mit durchschnittlich 55 Jahren.

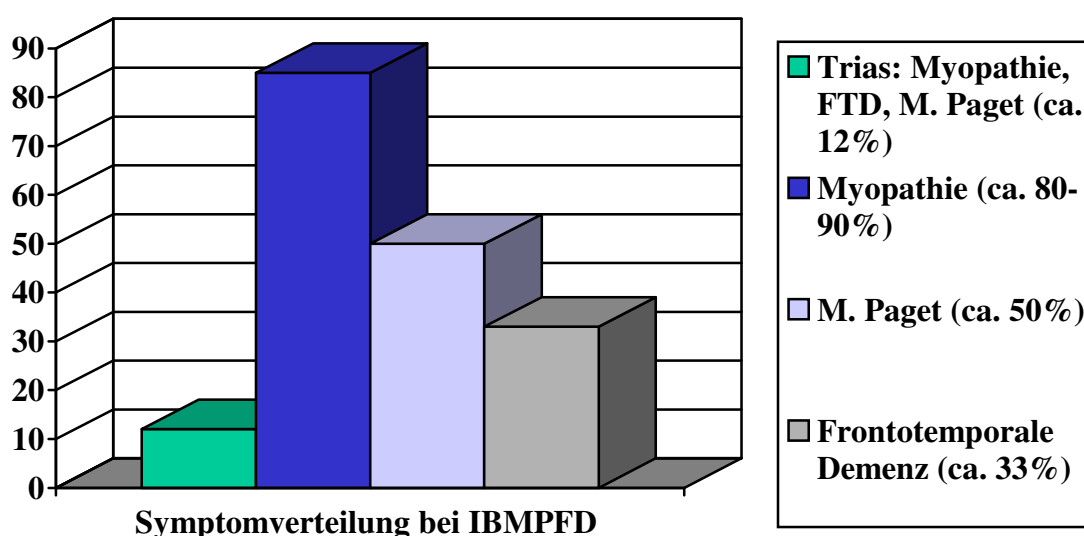


Abb. 1: Symptomverteilung bei IBMPFD Das Diagramm zeigt in einer vereinfachten Weise die Häufigkeit der Hauptsymptome. Erstellt aus Daten nach ([Kimonis, Fulchiero, et al. 2008](#)).

Ein gemeinsames Auftreten der charakteristischen Symptomtrias ist eher selten (12%), zumeist zeigt sich eine Muskelschwäche (in 80-90% der Fälle), bei etwa der Hälfte der Fälle ein Morbus Paget des Knochens und nur in einem Drittel der Fälle eine frontotemporale Demenz. Als gemeinsame Pathologie der drei Hauptsymptome zeigen sich ubiquitylierte Proteinaggregate und ein Zelluntergang in den betroffenen Geweben ([Ju and Wehl 2010](#)). Neben diesen vorherrschenden Symptomen treten in diesem Krankheitskomplex auch noch eine dilatative Kardiomyopathie, Leberfibrose, Katarakt, Stuhlinkontinenz oder eine sensomotorisch-axonale Neuropathie auf ([Guyant-Marechal et al. 2006](#), [Haubenberger et al. 2005](#), [Hubbers et al. 2007](#)).

Die genetische Ursache fand sich in autosomal-dominanten Mutationen im Valosin-Containing-Protein-(VCP)-Gen auf Chromosom 9 (chr9:35056065-35072739) ([Kimonis, et al. 2000](#), [Watts,](#)

[et al. 2004](#)). Mittlerweile sind zirka 20 unterschiedliche Punktmutationen als Krankheitsauslöser entdeckt worden ([Ju and Wehl 2010](#)).

Funktionen von VCP

Das Protein VCP ist ein evolutionär hoch konserviertes Protein, wird auch als CDC48/p97 bezeichnet und gehört der AAA+-ATPase-Superfamilie an ([Alexandru et al. 2008](#)). Es ist von der Hefe *S. cerevisiae* bis hin zum Menschen hochkonserviert ([Watts, et al. 2004](#)).

Seine zellulären Funktionen sind vielfältig und reichen von DNA-Reparatur-Mechanismen, Zellzykluskontrolle, Rekonstruktion der Zellkernhülle, Funktionen im Bereich der ATP-Bindung und Hydrolyse über Aktivierung der Transkription bis hin zur Apoptose, Autophagie und dem Proteinabbau im Endoplasmatischen Retikulum ([Franz et al. 2013](#), [Halawani and Latterich 2006](#), [Jarosch et al. 2002](#), [Meyer et al. 2012](#), [Rabinovich et al. 2002](#), [Rabouille et al. 1998](#)). Bei diesem sogenannten ERAD (=Endoplasmatisches-Retikulum-assoziiierter Proteinabbau) handelt es sich um eine Art Qualitätskontrolle für neu gebildete Proteine, durch welches aberrante Polypeptide zerstört werden. Fast alle dieser zellulären Aufgaben stehen direkt oder indirekt mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) in Verbindung ([Brunger and DeLaBarre 2003](#)). Des Weiteren bindet VCP auch an Polyglutamin [poly(Q)]-Proteinaggregate. Dies hat in Versuchen mit VCP-Mutanten bei Fruchtfliegen Hinweise auf neuronale Degeneration ergeben ([Ju et al. 2008](#), [Ju and Wehl 2010](#), [Kobayashi et al. 2002](#)).

Struktur von VCP

Die Struktur des VCP-Proteins ist dreigeteilt: es besteht aus zwei ATPase-Domänen (D1 und D2) ([Confalonieri and Duguet 1995](#), [Wang et al. 2004](#)), zwei Linker-Domänen (L1 und L2) sowie einer N-terminalen und C-terminalen Domäne. Die zentralen D-Domänen binden und hydrolysieren ATP ([Brunger and DeLaBarre 2003](#)), während die N-Domäne (CDC48) Polyubiquitin und Kofaktoren bindet.

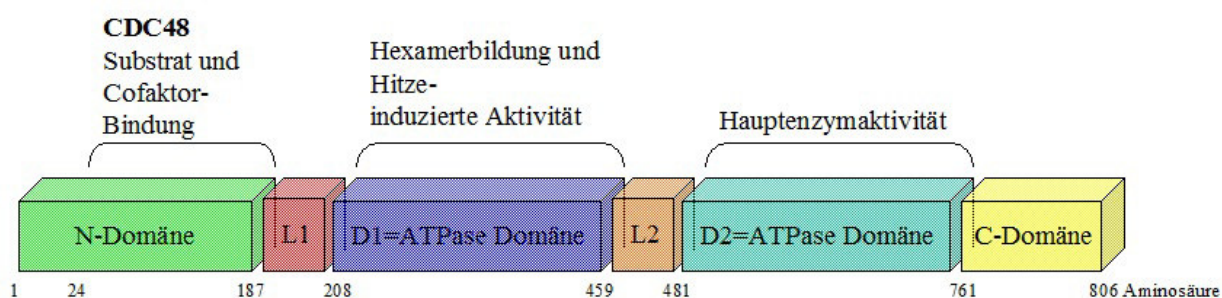


Abb. 2: Domänenstruktur des VCP-Gens Die Abbildung zeigt die Anordnung der verschiedenen Domänen des VCP-Proteins mit der jeweiligen Aminosäureposition und ihre Hauptfunktion. Modifiziert nach ([Hubbers, et al. 2007](#)).

Das fertig gefaltete, aktive Protein bildet eine Homohexamerstruktur mit einer zentralen Öffnung und ist in der Lage, an diverse Adapterproteine anzudocken. Dadurch ist es möglich, gewisse Substrate zu kennzeichnen, welche abgebaut werden sollen ([Kondo et al. 1997](#), [Meyer et al. 2000](#)).

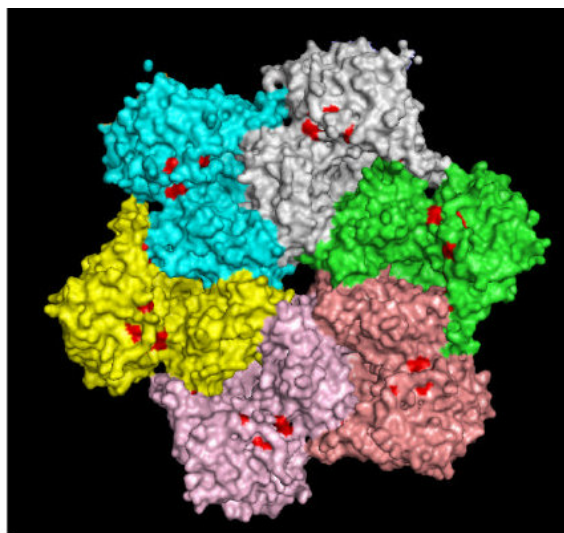


Abb. 3: VCP-Hexamer Die einzelnen Monomere sind jeweils in einer anderen Farbe dargestellt. Bekannte Mutationen sind rot markiert. Übernommen aus ([Weihl et al. 2009](#)).

Es wurden bisher 20 unterschiedliche Mutationen im Zusammenhang mit IBMPFD im *VCP*-Gen gefunden wurden. Die meisten davon befinden sich in der N-Domäne und der L1-Linkerdomäne (Exon 1-5), sowie in der D1-ATPase Domäne (Exon 6-10) ([Nalbandian et al. 2011](#), [Weihl, et al. 2009](#)). Es gibt sogenannte „mutations hot spots“, z. B. Codon 155 in Exon 5 des *VCP*-Gens.

Derzeit gibt es keinen Hinweis auf eine regionale Häufung des Auftretens der Erkrankung, weltweit sind um die 40 Familien bekannt, bei denen eine IBMPFD identifiziert wurde. Die Prävalenz ist nicht genau bekannt. Die Diagnose einer IBMPFD wird vermutlich zu selten gestellt ([Kimonis, Mehta, et al. 2008](#)). Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung ist eine einheitliche, spezifische Klinik relativ schwer auszumachen. Eine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist daher sehr schwer zu etablieren, da selbst bei Mitgliedern der gleichen Familie, die identische Mutationen tragen, die Krankheitsausprägung sehr unterschiedlich ist ([Kimonis, Mehta, et al. 2008](#), [Waggoner et al. 2002](#)).

Der Verlauf der Erkrankung ist chronisch progredient. Die Patienten sind im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auf eine Gehhilfe oder einen Rollstuhl angewiesen und versterben durch respiratorisches oder kardiales Organversagen oder im Rahmen des Endstadiums der Demenz.

Bezüglich der genetischen Beratung betroffener Patienten sind besondere Aspekte zu berücksichtigen: Für den Patienten ist vornehmlich der variable Befall der verschiedenen Organsysteme und die Unvorhersehbarkeit des Ausbruchszeitpunkts der Krankheit sowie die Möglichkeit des Verlusts der geistigen Fähigkeiten belastend. So sind besonders die Beeinträchtigung der Lebensqualität und das Übertragungsrisiko auf die Kinder erfahrungsgemäß zentrale Themen bei der humangenetischen Beratung ([Viassolo et al. 2008](#)).

2.1.1 Einschlusskörpermyopathie

2.1.1.1 Klinik

Die Myopathie tritt in einem Drittel der Fälle isoliert auf und äußert sich in der körperlichen Untersuchung in einer progredienten Schwäche und Atrophie der Gliedergürtelmuskulatur, hier besonders der oberen Extremität mit einer Scapula alata ([Guyant-Marechal, et al. 2006](#), [Haubenberger, et al. 2005](#)). Es ist vermehrt die proximale Muskulatur betroffen, es können aber auch die distale sowie die mimische Muskulatur betroffen sein ([Kovach et al. 2001](#)). Weitere Symptome können eine Fußheberschwäche oder eine Lordose sein ([Kimonis, Mehta, et al. 2008](#), [Waggoner, et al. 2002](#)). Die Muskeleigenreflexe sind meist abgeschwächt oder aufgehoben. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle haben die Patienten keine Myalgien. Es gibt eine deutliche klinische Ähnlichkeit mit der Gliedergürteldystrophie ([Watts, et al. 2004](#)). Die Muskelschwäche kann sich entweder symmetrisch oder asymmetrisch präsentieren. Die Sensorik ist überwiegend nicht eingeschränkt ([Kimonis, Fulchiero, et al. 2008](#), [Kovach, et al. 2001](#)).

Laborchemisch ist die Serum-Kreatinkinase im Gegensatz zu anderen Muskelerkrankungen nicht oder nur gering erhöht, während die Elektromyographie (EMG) entweder myopathische oder neuropathische Veränderungen zeigt. Es dominieren kurze, kleine polyphasische Aktionspotenziale, eine „irritable myopathy“, Fibrillationen, „positive sharp waves“ und myopathische Potentiale. Die Nervenleitgeschwindigkeit ist in den meisten Fällen normal ([Kovach, et al. 2001](#)).

Eine MRT in der T1-Wichtung (ggf. zusätzlich mit Kontrastmittelgabe zur verbesserten Darstellung von entzündlichen Veränderungen) ist hilfreich bei der Auswahl geeigneter Muskelpartien für eine weiterführende diagnostische Muskelbiopsie sowie zum Ausschluss einer entzündlich bedingten Myositis bzw. einer sporadischen Einschlusskörpermyositis (sIBM). In der fettunterdrückten SPIR-Sequenz kann ein Muskelödem am besten erkannt werden ([Fischer et al. 2005](#)). Hübbers et al. beschreiben auch verbreitete MRT-Signaländerungen und eine fettige Degeneration in der T1-Wichtung und der T2 SPIR-Sequenz in den betroffenen Muskeln ([Hübbers, et al. 2007](#)).

Nichtinvasive Diagnostik kann jedoch nur richtungsweisend begriffen werden. Eine genauere Differenzierung gelingt meist nur mit einer Muskelbiopsie. In den histologischen Muskelschnitten sieht man bei knapp der Hälfte der Patienten so genannte „rimmed vacuoles“. Dies sind charakteristisch umrandete Vakuolen in Muskelfasern, welche lichtmikroskopisch in der Haematoxylin-Eosin (HE) oder Gomori-Trichrom-Färbung sichtbar werden. In der Elektronenmikroskopie sieht man charakteristische Filamente in diesen Einschlüssen. Nicht selten finden sich im Ergebnis der Muskelbiopsie allerdings ausschließlich myopathische Veränderungen ohne Vakuolen oder eine fettige Degeneration des Muskels bei bereits stark geschädigtem Muskel.

Bei Verdacht auf eine IBMPFD sollte in jedem Fall eine genetische Untersuchung erfolgen.

In späteren Phasen der Erkrankung kommt es in einigen beschriebenen Fällen auch zu einem Befall des Herzmuskels mit dilatativer Kardiomyopathie mit Einschlusskörperchen und daraus folgendem Herzversagen ([Kimonis, et al. 2000](#)). Es konnten von Hübbers et al. auch Ubiquitin-positive Zellkerneinschlüsse und zytoplasmatische Aggregate in Herzmuskelzellen nachgewiesen werden ([Hubbers, et al. 2007](#)). Daraus ergibt sich die dringende Indikation einer sorgfältigen kardialen Anamnese und entsprechender fachärztlicher Weiterversorgung sowie weiterführenden kardiologischen Untersuchungen bei unklaren Myopathien.

2.1.1.2 Pathologie

Die genaue Pathologie und der Pathomechanismus der Erkrankung sind noch nicht hinreichend verstanden. Die pathologischen Veränderungen der muskelspezifischen Symptome der IBMPFD zeigen sich am besten in der histologischen Untersuchung erkrankten Muskelgewebes im Lichtmikroskop und im Elektronenmikroskop. Durch geeignete Färbungen findet man in vielen Fällen krankhafte Veränderungen der Morphologie des Muskels.

Neben reinen degenerativen Veränderungen wie einer fettigen Degeneration zeigten sich in der mikroskopischen Darstellung mit den geeigneten Immunfärbungen häufig Ubiquitin-positive und TAR-DNA-binding Protein-43 (TDP-43)-positive Proteinaggregate. In der Elektronenmikroskopie finden sich oft tubulofilamentäre Einschlüsse (sogenannte „rimmed vacuoles“) sowohl im Sarkoplasma als auch subsarkolemmal und im Zellkern gelegen ([Hubbers, et al. 2007](#), [Kimonis, Fulchiero, et al. 2008](#), [Watts et al. 2007](#)). Der Nachweis dieser „rimmed vacuoles“ ist aber keine Bedingung für das Vorliegen einer IBMPFD. Die Filamente in den Einschlüssen sind Desmin-positiv, was eigentlich ein Zeichen für primäre Desminopathien und Myofibrilläre Myopathien ist ([Bar et al. 2005](#), [Schroder et al. 2003](#), [Selcen et al. 2004](#)). Möglicherweise wird auch das Desmin-Zytoskelett in Folge von VCP-Mutationen verändert oder beeinträchtigt.

Bei Immunfluoreszenzfärbungen mit VCP-Antikörpern zeigten sich folgende Ergebnisse: Im gesunden Muskel zeigte sich eine Anfärbung von endomysialen Gefäßen, Lipofuszinakkumulationen und zu einem geringen Teil Muskelfaserzytoplasma. Bei der IBMPFD konnten Zellabfälle in Einschlüssen und Vakuolen in verschiedenen großen abgerundeten Aggregaten in vereinzelten Muskelfasern nachgewiesen werden ([Watts, et al. 2004](#)).

Zu weiteren myopathischen Befunden gehörten Schwankungen der Muskelfasergröße, eine Faseratrophie beider Muskelfasertypen, hypertrophe Typ-1-Fasern, myopathische Gruppierungen, vermindertes endomysiales Bindegewebe sowie basophile Ablagerungen ([Hubbers, et al. 2007](#), [Kovach, et al. 2001](#)). In Ablagerungen im Muskel fand man außerdem gelegentlich β -Amyloid und phosphoryliertes Tau-Protein, welche auch bei diversen degenerativen ZNS-Erkrankungen in Aggregaten zu finden sind ([Askanas and Engel 2006](#), [Wojcik et al. 2004](#)).

Die Ansammlung von Proteinaggregaten in Zellen ist ein Pathomechanismus, der bei verschiedenen, besonders neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet wird (M. Alzheimer, Tauopathien, Aggregatmyopathien, Frontotemporale Demenz). Bei der IBMPFD, einer Erkrankung die sowohl einen neurodegenerativen Aspekt des ZNS als auch einen Muskelbefall beinhaltet, finden sich sowohl im Gehirn als auch in der Muskulatur TDP-43-positive, Ubiquitin-positive Einschlusskörperchen. Ursache für solch eine ungewöhnliche Ansammlung von

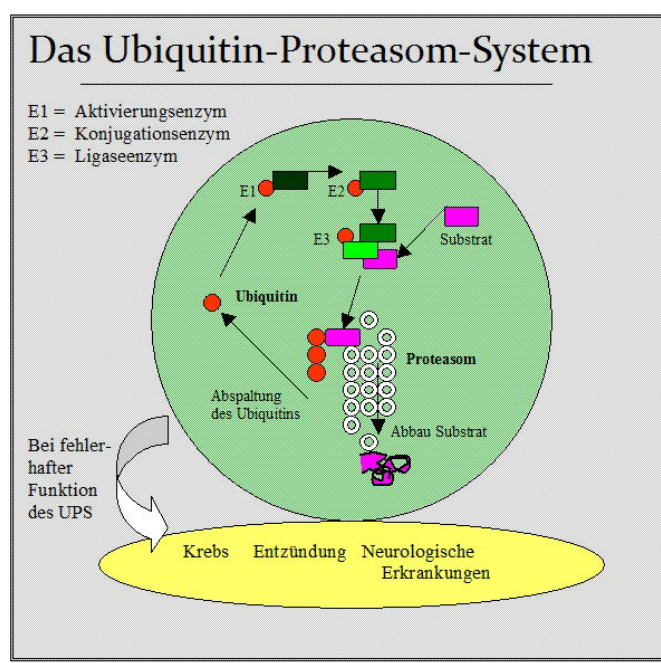


Abb. 4 Schematische Darstellung der Ubiquitin-Proteasom-System Substrate, die abgebaut werden sollen werden durch Ubiquitin-Ketten markiert. Hierzu werden die Enzyme E1-E3 benötigt. Eine fehlerhafte Funktionsfähigkeit des UPS führt zu diversen Erkrankungen. Modifiziert nach Hilt W: Das Ubiquitin-Proteasom-System in Proteinqualitätskontrolle und Regulation. In BIOSpektrum. 04/2005. Spektrum Akademischer Verlag, S. 446 (http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs.pdf&_id=934667; abgerufen am 12.03.2014).

Zellbestandteilen kann einerseits ein vermehrter Anfall von fehlerhaften Proteinen sein, andererseits kann hier auch der Umsatz und Abbau solcher Proteine gestört sein.

Ein sehr gut erforschtes System der zelleigenen Proteinhomöostase ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ([Amm et al. 2013](#)). Eine Dysbalance von Faktoren in diesem fein abgestimmten System kann zu Erkrankungen führen.

Die Funktion von VCP hängt eng mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) sowie anderen Systemen zum Abbau von Proteinen zusammen wie der (Makro)Autophagie ([Weihl et al. 2008](#)). VCP bildet ein Homohexamer und fungiert als molekulares Chaperon, das Bindungen mit verschiedenen Proteinen eingeht, welche UPS-Aktivität besitzen ([Viassolo, et al. 2008](#)). Dieser VCP-Komplex bindet an polyubiquitylierte Proteinketten, befreit ubiquitylierte Proteine von ihrem Bindungspartner und vereinfacht so den Transport zum UPS. Der Verlust der VCP-Funktion führt zu einer Ansammlung polyubiquitylierter Proteine, Vakuolen und Einschlusskörperformationen ([Dai and Li 2001](#), [Forman et al. 2004](#)) und verhindert die Aggresom- und Proteasombildung ([Bird et al. 2003](#), [Cruts et al. 2006](#), [Forman, et al. 2004](#), [Ju, et al. 2008](#)). VCP fungiert als Mittler beim Umsatz verschiedener UPS-Substrate wie HIF-1-alpha (hypoxia inducible factor-1-alpha), Unc45b (skeletal muscle myosin chaperone) und IkappaB (inhibition of kappa B) ([Alexandru, et al. 2008](#), [Dai et al. 1998](#), [Janiesch et al. 2007](#)). Bei *in vitro*-Studien zeigte sich, dass bei mutiertem VCP die ATPase Aktivität erhöht ist ([Ju and Weihl 2010](#)).

Die mögliche Erklärung der VCP-assoziierten Krankheiten beruht auf Fehlfunktionen in Ubiquitin-basierenden Abbauwegen wie z. B. ERAD (Endoplasmatisches-Retikulum assoziierter Proteinabbau). Die Liganden-Bindungsstellen des VCPs werden durch die humanen Mutationen verändert, so dass der ERAD nur unzulänglich funktioniert und Ansammlungen von ubiquitylierten Proteinen entstehen ([Halawani and Latterich 2006](#), [Hubbers, et al. 2007](#)). Auch ein „gain-of-function“ Mechanismus des mutierten VCPs mit schädigender bzw. toxischer Wirkung der akkumulierten ubiquitinierten Proteine wird diskutiert ([Weihl et al. 2007](#)).

Neben dem Ubiquitin-Proteasom-System in der Zelle ist auch die Autophagozytose essentiell für das Gleichgewicht der Proteine in der Zelle ([Ju and Weihl 2010](#)). Offenbar sind bei der Störung des UPS und des ERAD nicht alle, sondern nur einige Substrate betroffen, wohingegen weitere Proteine mittels Autophagie abgebaut werden ([Rubinsztein 2006](#)). Morbus Pompe und das Danon-Syndrom sind beispielsweise neuromuskuläre Erkrankungen, bei denen Defekte im Autophagie-System identifiziert werden konnten ([Nishino 2003](#), [Nishino et al. 2000](#), [Raben et al. 2012](#)). Offenbar sind bei der IBMPFD beide Abbauwege der Zelle beeinträchtigt, wodurch es

zusätzlich noch zu Vakuolenbildung und Akkumulation von Autophagosomen kommt ([Ju and Weihl 2010](#)).

Das Verständnis des Zusammenhangs zwischen *VCP*-Mutationen und dem akkumulierten TDP-43-Protein bedarf noch weiterer Forschungen. Bisher weiß man, dass TDP-43 ein hochkonserviertes, ubiquitär exprimiertes Zellkernprotein ist. Es spielt eine Rolle bei der Regulation der Translation und Transkription und beim prä-mRNA-Spleißen ([Warraich et al. 2010](#)). Weiterhin fungiert es möglicherweise als Beschleuniger des Exon-Skippings oder als Unterdrücker der Transkription ([Rubinsztein 2006](#), [Schroder, et al. 2003](#), [Selcen, et al. 2004](#), [Siris et al. 1996](#), [Weihl, et al. 2008](#)). In der gesunden Muskelzelle befindet sich TDP-43 im Zellkern, während in erkrankten Myozyten das TDP-43 zusätzlich auch noch in großen, zytoplasmatischen Einschlüssen, welche mit Ubiquitin kolokalisiert sind, nachgewiesen werden kann. Die genaue Bedeutung dieser TDP-43-Ansammlungen ist noch unklar. Nach dem gegenwärtigen Verständnis entstehen TDP-43-positive Aggregate, da *VCP*-Mutationen offenbar eine veränderte Funktionsfähigkeit des Proteins zur Folge haben ([Weihl, et al. 2008](#)). Eine andere Erklärung wäre eine ähnliche Pathologie wie bei M. Alzheimer oder Tauopathien, also eine Ablagerung des defekten Proteins TDP-43 ([Forman et al. 2006](#), [Neumann et al. 2007](#), [Viassolo, et al. 2008](#)).

Fest steht, dass auch bei neurodegenerativen Erkrankungen TDP-43-Einschlüsse in Neuronen nachweisbar sind. Bisher sind in dieser Gruppe von Erkrankungen die amyotrophe Lateralsklerose und eine Unterform der Frontotemporalen Demenz (FTDL-TDP) bekannt. Letztere kann in der Symptomtrias der IBMPFD auftreten, sodass ähnliche gemeinsame Pathomechanismen, d. h. Störungen im UPS und der Autophagie vermutet werden ([Watts, et al. 2004](#)).

2.1.2 Morbus Paget

2.1.2.1 Klinik

Bei einem M. Paget (PDB, Paget's disease of bone) handelt es sich um eine Erkrankung des Skelettsystems, bei der es zu einem gesteigerten Umbau von Knochen kommt, der mit muskuloskelettalen Schmerzen, Knochenfehlbildung und veränderter Knochenstruktur einhergeht. Der Knochen ist häufig verdickt, aber vermindert belastbar. Der Knochenbefall bei der IBMPFD tritt charakteristischerweise deutlich früher auf als beim sporadischen M. Paget. Der Altersdurchschnitt liegt bei 42 Jahren, verglichen mit 50-55 Jahren beim sporadischen PDB ([Bird, et al. 2003](#), [Forman, et al. 2006](#)).

Wirbelsäule, Schädelknochen und Becken zählen zu den charakteristischen Manifestationsorten. Manchmal sind auch Röhrenknochen befallen. Abgesehen von einer offenbar besonders stark betroffenen Familie mit einer Mutation im *VCP*-Gen an der Stelle A232E wurden keine vermehrten Frakturen beschrieben ([Kimonis, Mehta, et al. 2008](#)).

Laborchemisch findet man im Serum eine erhöhte alkalische Phosphatase (durchschnittlich 389 U/L, normal 30-130 U/l) und erhöhte Pyridinoline und Desoxypyridinoline im Urin.

Radiologische Zeichen eines M. Pagets sind eine grobe Trabekelstruktur, kortikale Verdickungen und gesprenkelte Sklerosierungen. Makroskopisch finden sich lakunäre Substanzdefekte im osteoporotisch erscheinenden Knochen.

Im Skelettszintigramm erkennt man eine gesteigerte Technetium-99m-Phosphonat-Aufnahme des Knochens an den betroffenen Stellen ([Waggoner, et al. 2002](#)). Diese radiologischen Veränderungen können bis zu 10-15 Jahre vor den ersten Symptomen sichtbar sein ([Farpour et al. 2012](#), [Kimonis, Mehta, et al. 2008](#)).

Sekundäre Probleme können ein Befall der Gelenke sein, der zu Schmerzen, Knorpelschäden und Arthritis führt. Gravierende Komplikationen können auftreten, wenn die Wirbelsäule betroffen ist und daraus eine Querschnittslähmung resultiert. Eine weitere Komplikation entsteht bei Befall des Schädelknochens, die bis zum Verlust des Hörvermögens gehen kann ([Lipton et al. 2004](#)).

2.1.2.2 Pathologie

In der feingeweblichen Untersuchung erkrankten Knochens zeigen sich abnorme, überaktive Osteoklasten, welche besonders groß sind und Paramyxovirus-ähnliche Einschlüsse haben ([Mills and Singer 1976](#), [Wang, et al. 2004](#)). Es finden sich Unterbrechungen der normalen Knochenstruktur sowohl in der Kortikalis als auch in der Spongiosa. Es handelte sich um hypertrophe Trabekelstrukturen mit Mosaikmuster, neu gebildete Knochenformationen und eine Proliferation fibrösen Bindegewebes im Markraum, was mit einer Fibrodysplasie vereinbar ist.

In der ultrastrukturellen Ansicht können Zellkerneinschlüsse nachgewiesen werden. Diese bestehen aus tubulären, geraden Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 15 nm. Strukturell ähneln sich die Einschlüsse in Osteoklasten mit jenen in Muskelfasern.

Des Weiteren wurden bei IBMPFD-Patienten Einschlüsse im Zellkern sowie im Zellplasma der Osteoklasten nachgewiesen, die sich strukturell nicht von denen bei der sporadischen PDB unterscheiden ([Kimonis, Mehta, et al. 2008](#)).

2.1.3 Frontotemporale Demenz

2.1.3.1 Klinik

Die Frontotemporale Demenz betrifft hauptsächlich den Frontal- und den Temporallappen und tritt im Falle der IBMPFD deutlich früher auf als andere Demenzformen. Der Ausbruch der Krankheit beginnt mit durchschnittlich 54 Jahren und äußert sich bei der Frühform mit Verhaltensänderungen bei relativem Erhalt des Gedächtnisses. Als weiteres Symptom treten Sprachstörungen auf, hierbei ist sowohl das aktive Sprachvermögen als auch das Sprachverständnis betroffen ([Dai and Li 2001](#)).

Auffällig ist auch eine Verschlechterung im sozialen Umgang, was sich in Enthemmtheit, Apathie, fehlender Einsicht oder Agitiertheit äußern kann ([Kovach, et al. 2001](#)).

Wichtig sind folglich eine sorgfältige klinische Untersuchung und neuropsychologische Testungen [Mini-Mental-Status-Test (MMST), CERAD-Testbatterie] mit dem Fokus auf Verhaltensänderungen, Sprache, Gedächtnis und Orientierung ebenso wie der zerebralen Bildgebung.

2.1.3.2 Pathologie

Das klinische Syndrom einer frontotemporalen Demenz kann verschiedene Ursachen haben. In Frage kommen sogenannte Tauopathien (z. B. M. Pick), also Erkrankungen mit pathologischen Ansammlungen des Tau-Proteins im Gehirn. Noch häufiger sind frontotemporale Demenzformen mit Ubiquitin-positiven Einschlüssen in Nervenzellen (FTDL-U) ([Hodges et al. 2004](#), [Okamoto et al. 1991](#)). Hier gilt dann noch die Anfärbbarkeit von verschiedenen Marker-Proteinen als Unterscheidungskriterium ([Rademakers et al. 2012](#)):

- FTDL-TDP: Frontotemporallappen-Degeneration mit TDP-43-positiven Einschlüssen
- FTDL-FUS: Frontotemporallappen-Degeneration mit FUS-positiven Einschlüssen
- FTDL-tau: Frontotemporallappen-Degeneration mit tau-positiven Einschlüssen

Die Neuropathologie bei Patienten mit VCP-Mutationen im Rahmen einer IBMPFD unterscheidet sich von den Fällen familiärer oder sporadischer FTDL-U ohne diese Mutation und wird unter die Gruppe FTDL-TDP eingeordnet. Bei Untersuchungen des Gehirns von Patienten mit FTD bei IBMPFD zeigen sich makroskopisch eine deutliche Atrophie des Frontal- und des Temporallappens sowie des Striatums. Zeichen der unspezifischen Nervenzellschädigung sind eine Gliose und Spongiose in den betroffenen Gehirnarealen.

Mikroskopisch erkennt man in den besonders betroffenen Gehirnarealen wie im Frontal- und Temporallappen, dem Neokortex sowie limbischen und subkortikalen Kernen zahlreiche Ubiquitin -und TDP-43-positive Einschlüsse in Nervenzellkernen und dystrophe

Nervenzellfortsätze, welche in den anderen FTDL-U Formen gar nicht oder nur ganz vereinzelt zu sehen sind. Sie dienen als mikroskopisches Unterscheidungsmerkmal ([Mackenzie and Feldman 2005](#), [Mullis 1990](#)). Ein weiteres charakteristisches Merkmal der FTD bei IBMPFD ist, dass die Einschlüsse immunhistochemisch gewöhnlich nicht mit anderen Antikörpern gegen Tau, alpha-Synuclein und β -Amyloid angefärbt werden können ([Huizing and Krasnewich 2009](#), [Janiesch, et al. 2007](#)).

Die Pathogenese der Erkrankung ist bisher nur unvollständig verstanden, jedoch gibt es verschiedene Erklärungsversuche, wie die jeweilige VCP-Mutation zu den oben beschriebenen pathologischen Veränderungen führt. Es gibt offenbar Ähnlichkeiten im Pathomechanismus bei der Entstehung der Muskelpathologie und der Gehirnpathologie, so dass ähnliche Abläufe der Krankheitsentstehung diskutiert werden.

Eine Erklärung für das vergleichsweise seltene Auftreten der FTD im Symptomkomplex der IBMPFD könnte sein, dass die Patienten aufgrund ihrer Skelett und Herzmuskelbeteiligung versterben, bevor sich neurologische Symptome ausbilden können ([Brunger and DeLaBarre 2003](#)).

2.1.4 Therapie

Die Therapie der IBMPFD ist vielschichtig und muss individuell auf die jeweilige Ausprägung der Symptome angepasst werden. Bisher stehen leider keine direkten kausalen medikamentösen Therapieoptionen zur Verfügung. Daher stehen überwiegend supportive Maßnahmen im Vordergrund. Hierzu gehören regelmäßige Physiotherapie, Ergotherapie und eine angepasste Hilfsmittelversorgung.

Therapeutisch werden bei Knochenbefall Bisphosphonate wie Risedronat (Actonel®) oder Alendronat (Fosamax®) verordnet. Ihr Wirkmechanismus funktioniert über eine Störung des Zellstoffwechsels oder über eine Verminderung der Osteoklastenaktivität bis hin zur Apoptose ([Ayala et al. 2005](#), [Klein and Norman 1995](#), [Siris, et al. 1996](#)).

Bei beginnender Demenz werden Antidementiva nach individueller Entscheidung und je nach begleitender psychiatrischer Beteiligung auch Antidepressiva verordnet. Von ACE-Hemmern mit ihrem kardioprotektiven Wirkprofil können Patienten mit begleitender Kardiomyopathie profitieren.

Für die Myopathie gibt es keine gesicherten medikamentösen Therapieoptionen, ein Versuch mit einer intravenösen Immunglobulintherapie (IVIG) kann aber durchaus gerechtfertigt sein, insbesondere wenn eine inflammatorische Komponente muskelbiptisch nachgewiesen wird. Im Verlauf der Erkrankung kann bei zunehmender Ateminsuffizienz eine nicht-invasive Beatmung ins Behandlungsregime aufgenommen werden.

Neuere Therapien wie beispielsweise eine gezielte Gentherapie sind derzeit Gegenstand der Forschung.

2.2 Myotilinopathien

Die heterogene Gruppe der Myotilinopathien umfasst Erkrankungen, die mit einer Mutation im Myotilin (*MYOT*) – Gen einhergehen. Zu den beschriebenen Krankheiten zählen:

- LGMD1A (Limb-Girdle-Muscular-Dystrophy Typ1 – Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 1)
- Myofibrilläre Myopathie (MFM)
- Spheroid-Body-Myopathie
- Distale Myopathie

Myotilin ist ein hochkonserviertes Protein, das vom *MYOT*-Gen auf Chromosom 5q31 kodiert wird ([Salmikangas et al. 1999](#), [van der Ven et al. 2000](#), [Yamaoka et al. 1994](#)) und vorwiegend in der Z-Scheibe von Sarkomeren im Muskel vorkommt. Es wurde eine starke Expression im Skelettmuskel und eine schwache Expression im Herzmuskel und in peripheren Nerven nachgewiesen ([Salmikangas, et al. 1999](#)). Die N-terminale Region ist sehr Serin-reich und bindet an Alpha-Actinin, mit der C-terminalen Region bindet es an Filamin C. Es bindet an F-Actinin, verbindet und vernetzt Aktinfilamente und ist in der Lage, Dimere zu binden ([Salmikangas et al. 2003](#)). Myotilin ist offenbar ein wichtiger Stabilisator und Ankerpunkt für dünne Filamente in der Muskelzelle. Am Aufbau der Z-Scheibe ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Proteine (Alpha-Actinin, Titin, Nebulin, ZASP, Telethonin) beteiligt und Myotilin spielt hierbei eine entscheidende Rolle für die Struktur und Stabilität.

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die LGMD1A, die Gliedergürteldystrophie Typ 1 gelegt. Es handelt sich um eine autosomal-dominante Erkrankung, die durch Mutationen im *MYOT*-Gen verursacht wird ([Hauser et al. 2002](#), [Hauser et al. 2000](#), [Salmikangas, et al. 2003](#)). Klinisch präsentieren sich die Patienten häufig mit einer proximalen Muskelschwäche mit Befall der Gliedergürtelmuskulatur, welche im Verlauf nicht selten in eine zusätzliche distale Muskelschwäche übergeht. Das durchschnittliche Alter bei Ausbruch der Erkrankung bewegt sich zwischen 18 und 40 Jahren. Bei ca. 50% der betroffenen Patienten fällt eine dysarthrische, nasale Sprache auf ([Olive et al. 2005](#)). Weitere häufige Befunde sind eine Achillessehnenkontraktur und reduzierte Patellar- und Trizepssehnenreflexe ([Pegoraro and Hoffman 1993](#)). Laborchemisch ist häufig eine deutliche Erhöhung der Serumkreatinkinase (CK)-Werte festzustellen. In der Muskelbiopsie fallen zahlreiche „rimmed vacuoles“, Faserkalibervariationen und gespaltene Muskelfasern auf. Weitere Befunde sind filamentöse Aggregate und Untergang von Myofibrillen ([Gilchrist et al. 1988](#), [Hauser, et al. 2000](#)).



([Schroder and Schoser 2009](#)).

Die Therapie der LGMD1A beschränkt sich auf supportive Maßnahmen, da bisher keine kausale Behandlung bekannt ist. Hierzu gehören Physiotherapie, Ergotherapie, Vermeidung von Adipositas, individuell angepasste Hilfsmittelversorgung, fachärztliche orthopädische Mitversorgung, pulmonologische Diagnostik und ggf. Sauerstoffgabe sowie intermittierende nicht-invasive Beatmung bei respiratorischer Insuffizienz, außerdem eine eingehende humangenetische Beratung.

2.3 Vimentin als mögliches Kandidatengen für Myofibrilläre Myopathien

Intermediärfilamente sind gemeinsam mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli diejenigen Zellbestandteile, die für die Struktur und mechanische Stabilität der Zelle verantwortlich sind. (siehe hierzu auch Abb. 5). Zusammen bilden sie das Zytoskelett. Störungen im Aufbau des Zellskeletts sind Ursache für viele verschiedene Erkrankungen. Dabei handelt es sich häufig um Mutationen in Genen für die Zytoskelettproteine wie z.B. Desmin, Myotilin und Dystrophin. Sie führen zu den sogenannten hereditären Myopathien.

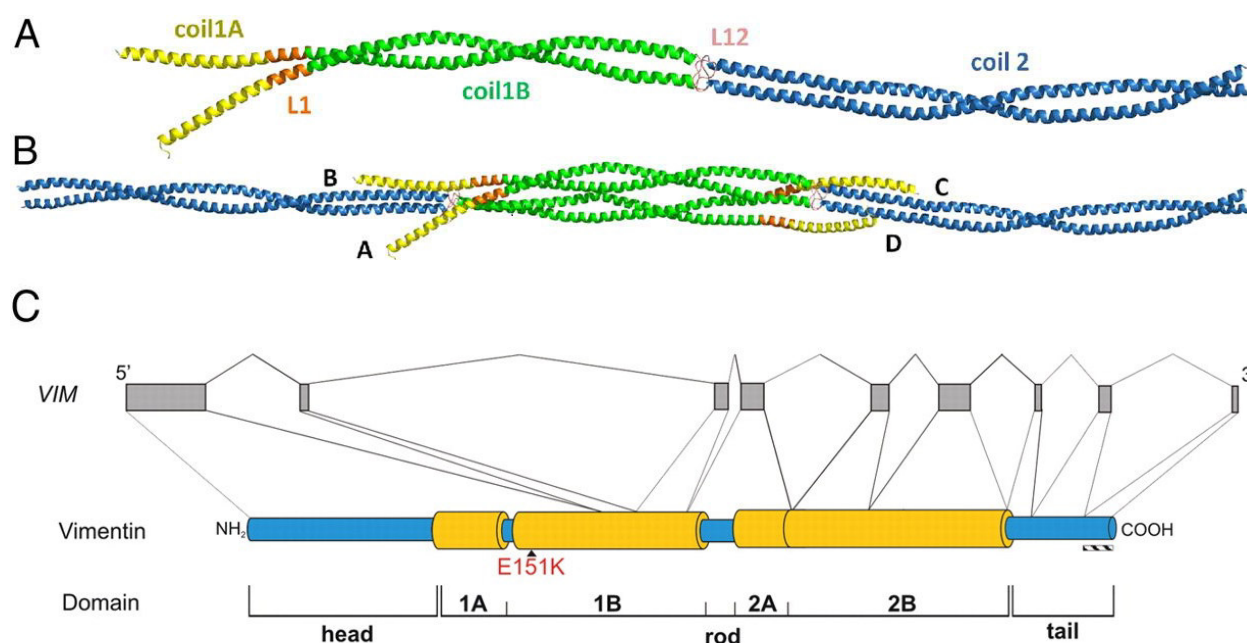


Abb. 6: Struktur von Vimentin Abbildung A zeigt das Vimentin-Dimer, die Abbildung B zeigt die dreidimensionale Struktur des Vimentin-Tetramers. Unter C ist das Vimentin-Gen und die Organisation der Proteindomänen abgebildet. Übernommen aus ([Chernyatina et al. 2012](#)) und ([Muller et al. 2009](#)).

Vimentin ist ein evolutionär hochkonserviertes Typ III – Intermediärfilament und ist an der Verbindung zwischen Zytoskelett und Plasmamembran beteiligt. Das *VIM*-Gen befindet sich auf

Chromosom 10p13 ([Ferrari et al. 1987](#)). Es wird in mesenchymalem Gewebe und in der Augenlinse exprimiert ([Muller, et al. 2009](#)). In der Entwicklung von Mäusemyoblasten wird initial Vimentin exprimiert, welches später durch Desmin in Myotuben und Muskel ersetzt wird ([Furst et al. 1989](#)). Seine weiteren Funktionen sind noch nicht umfassend verstanden. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe um Mor-Vaknin im Jahre 2003, dass Vimentin von Makrophagen sezerniert wird und offenbar auch eine Rolle bei der Immunabwehr spielt ([Mor-Vaknin et al. 2003](#)). Unklar ist jedoch weiterhin, welche Rolle Vimentin unter besonderen Umständen (z. B. Zellstress oder Proliferation) in der Zelle spielt. Mäuse, denen Vimentin fehlt, wiesen interessanterweise keinen klinisch fassbaren, auffälligen Phänotyp auf ([Colucci-Guyon et al. 1994](#)).

Wie beispielsweise das mdx-Mausmodell der Duchenne-Muskeldystrophie eindrucksvoll zeigt, ist der Schweregrad des muskulären Phänotyps in der Maus oft nicht auf den Menschen übertragbar. Bislang sind keine Studien bekannt, in denen das Vimentin-Gen bei hereditären Muskelerkrankungen systematisch analysiert wurde. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß genetische Veränderungen im humanen Vimentin-Gen zu Strukturveränderungen im Skelettmuskel führen können ähnlich wie Desmin- oder Filamin C-Mutationen bei den Myofibrillären Myopathien ([Schroder and Schoser 2009](#)). Deshalb ist eine molekulargenetische Analyse in einer klinisch gut definierten Patientenkohorte erforderlich, um die Hypothese zu überprüfen, ob Vimentin als mögliches häufiges Kandidatengen bei erblichen Muskelerkrankungen mit pathologischen Proteinablagerungen im Muskel in Frage kommt.

2.4 Differenzialdiagnosen

Die bedeutendsten Differenzialdiagnosen zu den oben genannten Erkrankungen (IBMPFD und LGMD1A) sind aufgrund ähnlicher Klinik andere Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD), weitere hereditäre Einschlusskörpermyopathien (hIBM 1-3) sowie andere hereditäre Myopathien und neurodegenerative Erkrankungen. Zu Letzteren gehört die sporadische Einschlusskörpermyositis (s-IBM), die Faszioskapulohumerale Dystrophie (FSHD), die distale Myopathie, die amyotrophe Lateralsklerose ([Johnson et al. 2010](#)) und die spinale Muskelatrophie ([Kimonis, Fulchiero, et al. 2008](#)).

2.4.1 Primäre Desminopathie (Ehemals HIBM1)

Bei der primären Desminopathie handelt es sich um eine Unterform der Myofibrillären Myopathien ([Dalakas et al. 2000](#)). Sie wird autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbt. Die Erkrankung betrifft die Skelett- und Herzmuskulatur ([van Spaendonck-Zwarts et al.](#)

[2011](#)). Ursächlich sind Mutationen im Desmin-Gen, welches auf dem Chromosom 2q35 lokalisiert ist. Die Patienten entwickeln ihre Erstsymptome überwiegend im Alter zwischen 30 und 40 Jahren. Klinisch präsentieren sich die Patienten sehr heterogen mit progredienter Muskelschwäche, welche in den distalen unteren Extremitäten beginnt und sich langsam ausbreitet (Nackenflexoren, axiale Muskulatur, mimische Muskulatur und Zwerchfell). Häufig sind diese Befunde mit kardialen Arrhythmien, Reizleitungsstörungen und restriktiver Herzinsuffizienz sowie plötzlichem Herztod assoziiert ([Goldfarb et al. 2004](#)). Histopathologisch finden sich im Skelettmuskel sowie im Herzmuskel Desmin-positive, eosinophile, amorphe Ablagerungen ([Dalakas et al. 2003](#)). Manchmal sind diese Ablagerungen auch Vimentin-positiv ([Dalakas, et al. 2000](#), [Goldfarb et al. 1998](#)).

2.4.2 GNE-Myopathie (HIBM2) – autosomal-rezessiv

Hierbei handelt es sich um eine im Erwachsenenalter auftretende, langsam progrediente distale Muskelschwäche. Sie wurde zuerst von Argov und Yarom 1984 bei einer Gruppe iranischer Juden beschrieben und 2001 die zu Grunde liegende genetische Ursache identifiziert ([Argov and Yarom 1984](#), [Eisenberg et al. 2001](#)). Als klinische Besonderheit ist eine Aussparung des M. quadriceps femoris vom Befall durch die Muskelschwäche typisch ([Huizing and Krasnewich 2009](#)).

Initiale Symptome sind Gangstörungen und Fußheberschwäche, später eine Schwäche im M. tibialis anterior, den Hand und Oberschenkelmuskeln mit Aussparung des M. quadriceps femoris, der sogar in weit fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung noch nahezu ungestörte Kraftentfaltung zeigen kann. Die Erkrankung verläuft langsam progredient, so daß ca. 20 Jahre nach Beginn der ersten Symptome die meisten Patienten an den Rollstuhl gebunden sind ([Broccolini et al. 2011](#)).

In der Histopathologie des Muskels sieht man typischerweise „rimmed vacuoles“ und charakteristische filamentöse Einschlüsse.

Das Gen *GNE*, welches das bifunktionale Enzym UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc)-2-Epimerase/*N*-Acetyl-Mannosamin (ManNAc)-Kinase kodiert, ist das einzige Gen, welches Mutationen zeigt, die in ursächlichem Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung stehen. Der Erbgang ist autosomal-rezessiv ([Farpour, et al. 2012](#)).

2.4.3 Erbliche Myosin-Myopathien (ehemals HIBM3)

Anders als die bisher genannten Erkrankungen beginnt die erbliche Myosin-Myopathie bereits kongenital mit Muskelkontrakturen und einer externen Ophthalmoplegie bei Geburt ([D'Amico et](#)

[al. 2013](#)). In der Kindheit sind die jungen Patienten meist klinisch unauffällig, ab dem Alter von ca. 30 Jahren ist allerdings häufig eine Reaktivierung der Erkrankung mit Entwicklung einer proximalen Muskelschwäche zu bemerken ([Darin et al. 1998](#)). Ursache der Erkrankung sind Mutationen im *MYH2* (Myosin heavy chain)-Gen. Die Krankheit wird meist autosomal-dominant vererbt. Histopathologisch finden sich “rimmed vacuoles” mit Einschlüssen im Zellkern und im Zytoplasma sowie dystrophe Veränderungen ([Darin, et al. 1998](#)).

2.4.4 Gliedergürtelmuskeldystrophie (LGMD)

Bei den meisten Patienten mit IBMPFD wird initial eine LGMD diagnostiziert, da sich die Klinik ähnelt und sich die Ergebnisse der Muskelbiopsie oft unspezifisch mit degenerativen Veränderungen darstellen. Patienten mit einer LGMD präsentieren sich charakteristischerweise mit Muskelschwäche in den Gliedergürtelmuskeln (Hüft- und Schultermuskeln) und histopathologisch mit dystrophen Muskelfasern ([Guglieri and Bushby 2008](#)). Auch der Herzmuskel kann betroffen sein. Das Krankheitsbild ist allerdings klinisch sehr heterogen und innerhalb der Gruppe der LGMDs gibt es eine Vielzahl an Untergruppen. Diese unterscheiden sich durch ihren Erbgang (autosomal-dominant/autosomal-rezessiv) und durch das zugrunde liegende mutierte Gen. Hierzu gehören unter anderem die Gene Myotilin, Calpain-3, Lamin A/C und Caveolin-3 ([Guglieri et al. 2008](#)).

2.4.5 Weitere hereditäre Myopathien und neurodegenerative Erkrankungen

Neben den oben genannten hereditären Erkrankungen gibt es noch eine Reihe weiterer Krankheiten, die differenzialdiagnostisch bedacht werden sollten. Sie sollen an dieser Stelle der Übersichtlichkeit halber nur knapp zusammengefasst werden.

Die sporadische Einschlusskörpermyopathie (sIBM) gehört zu den häufigsten erworbenen Muskelerkrankungen im Alter von über 50 Jahren in den westlichen Ländern. Klinisch präsentieren sich die Patienten mit langsam-progredienter Muskelschwäche. Diese betrifft die distalen wie auch die proximalen Muskeln. Außerdem kann die Schlundmuskulatur mitbetroffen sein. Histopathologisch finden sich lymphozytäre Infiltrationen, myopathische Veränderungen, Ansammlungen von Amyloid-verwandten Proteinen und Vakuolen ([Askanas and Engel 2003](#), [Dalakas 2006](#)). Die Ursache ist unbekannt. Es wird ein multifaktorielles Geschehen (Umweltfaktoren, genetische Prädisposition und Alterungsprozesse) vermutet ([Dalakas 2006](#)).

Die Fazioskapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD) ist die dritthäufigste Muskeldystrophie. (MIM #158900) Sie wird autosomal-dominant vererbt und betrifft – wie der Name vermuten lässt – vorwiegend die mimische Muskulatur, die Muskeln des Schultergürtels und der proximalen oberen Extremität ([Fisher and Upadhyaya 1997](#)).

Eine weitere Differenzialdiagnose ist die spinale Muskelatrophie (SMA), hier im speziellen der adulte Typ (SMA IV). Es handelt sich, im Gegensatz zu den bisher genannten Erkrankungen um eine alpha-Motoneuronerkrankung. Die SMA wird autosomal-rezessiv vererbt, das homozygot mutierte Gen *SMN1* (survival motor neuron 1) ist auf Chromosom 5q11.2-q13.3 lokalisiert ([Brzustowicz et al. 1990](#), [Lefebvre et al. 1995](#)). Klinische Symptome sind unter anderem Atrophie und Schwäche der proximalen Skelettmuskulatur ([D'Amico et al. 2011](#)).

Auch die Amyotrophe Lateralsklerose ([Johnson, et al. 2010](#)) reiht sich unter den alpha-Motoneuronerkrankungen ein und kann in den Anfangsstadien klinisch den hereditären Myopathien LGMD1A und IBMPFD ähneln. Die Zellen des motorischen Kortex, der Pyramidenbahn, des Hirnstamms und des Rückenmarks gehen bei dieser Erkrankung langsam unter ([Appel et al. 2011](#)). Die Schädigung des zweiten Motoneurons führt unter anderem zu Muskelschwäche und Muskelatrophie. Ca. 80% der Patienten präsentieren sich initial mit distaler oder proximaler Muskelschwäche ([Chen et al. 2013](#)). Nur etwa maximal 10% aller ALS-Fälle sind genetisch bedingt, alle anderen werden zur sporadischen ALS (sALS) gezählt ([Siddique and Deng 1996](#)). Genetische Ursachen werden immer mehr bekannt, besonders im Fokus befindet sich das *SOD1* (Superoxide Dismutase-1) Gen auf Chromosom 21q22.1. Aber auch Mutationen im *VCP*-Gen können selten eine ALS auslösen ([Johnson, et al. 2010](#)).

3 ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Speziell im klinischen Alltag stellt es eine große Herausforderung dar, die unterschiedlichen Muskelerkrankungen einem speziellen Genotyp zuzuordnen. Hier ist es sehr wichtig, differenzialdiagnostisch auch nicht-erbliche Erkrankungen zu bedenken und im Sinne einer Stufendiagnostik unter Einbeziehung des klinischen Phänotyps, der Familienanamnese und der Skelettmuskelhistologie eine molekulargenetische Diagnose anzustreben. Neuromuskuläre Erkrankungen gehören zu den seltenen Erkrankungen, so dass die genaue phänotypische Charakterisierung im Hinblick auf den Genotyp von großer Bedeutung ist, um das gesamte Spektrum der klinischen Symptomatik zu erfassen und die betroffenen Patienten möglichst umfassend im Hinblick auf die Prognose, die Familienplanung, mögliche Begleiterkrankungen und weitere Therapieoptionen beraten zu können.

Des Weiteren dient die molekulargenetische Analyse einer verbesserten Diagnostik und einem eingehenderen Krankheitsverständnis mit dem Ziel, zugrundeliegende Pathomechanismen aufzuklären, um im Sinne einer personalisierten Medizin kausale Therapien entwickeln zu können, die so spezifisch wie möglich wirken.

In der Praxis gibt es nicht selten Patienten mit degenerativen Muskelerkrankungen, die sich trotz ausführlicher molekulargenetischer Diagnostik keiner genau definierten genetischen Krankheit zuordnen lassen. Hier ist offensichtlich noch Forschungsbedarf, gezielt weitere mögliche Kandidatengene zu finden, was ein Teil dieser Arbeit war. Der Schwerpunkt lag bei den drei Kandidatengenomen VCP/p97 (*VCP*), Myotilin (*MYOT*) und Vimentin (*VIM*).

Mutationen im VCP/p97-Gen liegen dem seltenen Syndrom der IBMPFD (Einschlußkörpermyopathie assoziiert mit frontotemporaler Demenz und M. Paget des Knochens) zugrunde. In geeigneten Kandidaten-Patienten sollte zunächst die molekulargenetische Analyse des VCP-Gens durchgeführt werden. In den neu diagnostizierten IBMPFD-Patienten sollte anschließend eine erweiterte Phänotyp-Genotyp-Korrelation bei selteneren Mutationen vorgenommen werden, insbesondere im Vergleich mit weiteren IBMPFD-Patienten, die im Friedrich-Baur-Institut bereits identifiziert wurden und Fallberichten aus der Literatur.

Des Weiteren sollten im Zellkulturmodell *in vitro* häufigere und seltene VCP/p97-Mutanten verglichen werden, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung zu postmitotischen, terminal differenzieren Myotuben. Unter der Hypothese, dass VCP/p97-Mutanten u. a. die Myosinfilamentbildung stören, sollte die Ausbildung einer regelhaften Sarkomerstruktur im Zeitverlauf in transient transfizierten, myogenen Zellen untersucht werden.

Bei einer dominanten Gliedergürteldystrophie, der LGMD1A wurde ein bisher nicht beschriebener, heterozygot vorliegender Basenaustausch im Myotilin (*MYOT*)-Gen neu identifiziert, der mit der Muskelerkrankung innerhalb der betroffenen Familie segregierte. Es sollte geklärt bzw. ausgeschlossen werden, ob die Genvariante in einem gesunden Kontrollkollektiv vorkommt, um eine Krankheitsassoziation zu verifizieren. Des Weiteren sollte mit bioinformatischer Analyse die Pathogenität des resultierenden Aminosäureaustauschs überprüft werden.

Schließlich sollte in einem Kandidatengenansatz die Hypothese überprüft werden, ob weitere genetische Veränderungen in Proteinbestandteilen der pathologischen Proteinaggregate bei myofibrillären Myopathien vorliegen. Mutationen in myofibrillären Genen wie Desmin (*DES*), Myotilin (*MYOT*) und Filamin C (*FLNC*) gehören zu den häufigeren Ursachen dieser hereditären Muskelerkrankungen. Das Typ-III-Intermediärfilament Vimentin aus der Gruppe der Desmine kann in pathologischen Proteinablagerungen bei myofibrillären Myopathien vorkommen und legt einen Zusammenhang mit anderen Proteinaggregatmyopathien nahe. Deshalb sollte Vimentin (*VIM*) als interessantes neues Kandidatengen bei einer klinisch gut charakterisierten Patientenkohorte mit bislang nicht molekulargenetisch eingeordneter Einschlußkörpermyositis oder Einschlußkörpermyopathie auf mögliche neue Varianten oder Veränderungen untersucht werden.

4 MATERIALIEN UND METHODEN

4.1 Patienten und Untersuchungsmaterial

Genetische Veränderungen wurden bei Patienten mit Verdacht auf hereditäre Einschlusskörpermyopathie oder eine degenerative bzw. Myopathie untersucht.

Die Rekrutierung der Patienten, deren genetisches Material in den Versuchen verwendet wurde, erfolgte durch das Friedrich-Baur-Institut München. Ergänzt wurden die Proben durch Einsendung von Patientenmaterial (EDTA-Vollblut bzw. genomischer DNA) aus Kliniken im In- und Ausland. Nach ausführlicher Anamnese und Diagnostik (neurologische Untersuchung, elektrophysiologische Untersuchungen, ggf. MRT-Bildgebung betroffener Muskeln und Muskelbiopsie) wurde die molekulargenetische Untersuchung bei Verdacht auf eine hereditäre Genese angeschlossen. Dabei wurden die Gene *VCP*, *GNE*, Myotilin (*MYOT*) und Vimentin (*VIM*) untersucht. DNA-Proben gesunder Personen ohne neuromuskuläre Erkrankungen dienten als Normalkontrollen. Eine schriftliche Einwilligungserklärung der Patienten für die Durchführung genetischer Untersuchungen und DNA-Probenasservation gemäß Gendiagnostikgesetz (GenDG) §§ 8, 9 lag vor.

4.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Kits entsprachen höchsten Reinheitsanforderungen und stammten von den Firmen Fermentas, Invitrogen, Macherey&Nagel, New England BioLabs, Biotium, Promega, Peqlab und Qiagen.

4.3 Molekulargenetische Methoden

4.3.1 DNA Extraktion

Die genomische DNA-Extraktion erfolgte aus peripherem venösen EDTA-Vollblut unter Verwendung des Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.2.1 Prinzip der PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wurde 1983 von Mullis entdeckt. Sie ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes mittels spezifischer Primer (kurze Oligonukleotide) und einer thermostabilen DNA-Polymerase *in vitro* (Mullis 1990).

Dieses Verfahren wurde verwendet, um in den untersuchten Genen kodierende Regionen und angrenzende intronische Sequenzen zu amplifizieren ebenso wie mit geeigneten Mismatch-primern spezifische DNA-Sequenzen zu modifizieren, um mittels ortsgerichteter Mutagenese eine Punktmutation in einen Wildtyp-DNA-Abschnitt einzuführen.

3.3.2.2 PCR-Primer

In Gendatenbanken (z. B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) findet man die Basensequenzen der zu untersuchenden Gene. Basierend darauf wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) passende Primer erstellt und durch die Firma Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

3.3.2.3 Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen variierten je nach Gen und Exon, ein Standard-PCR-Protokoll sah aber typischerweise so aus:

25 µl	Maxima Hot-Start-Green PCR Mastermix (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland)
22 µl	dH ₂ O
1 µl (50 pmol)	sense primer
1 µl (50 pmol)	antisense primer
1 µl (100-500 ng)	genomische DNA
50 µl	Reaktionsansatz

Standard PCR-Protokoll

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf) durchgeführt.

Beispiel für ein PCR-Programm:

1. 95°C:	4 Min.	Denaturierung der DNA
2. 94°C	30 Sek.	Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge
3. 60°C	30 Sek.	Anlagerung der Primer (Annealing)
4. 72°C	1 Min.	Synthese des DNA-Doppelstrangs (Elongation)

Wiederholung von Schritt 2.-4.: 40 Zyklen

5. 72°C	7 Min.	Abschließende Elongation
---------	--------	--------------------------

Standard PCR-Programm

Modifikation des Standard-PCR-Programms:

Je nach Primer musste die Annealing-Temperatur an das jeweilige Optimum angepasst werden. Bei langen PCR-Fragmenten wurde die Elongationszeit auf 1,5 bis 2 Minuten erhöht. Bei Reamplifikationen wurde die Anzahl der Zyklen verringert.

Eine weitere Option war der Ansatz einer Nested-PCR, um unerwünschte Produktkontaminationen zu vermeiden. Diese Methode funktioniert mit zwei Primerpaaren: Mit den beiden äußeren Primern wurde eine erste PCR durchgeführt und eine zweite PCR eines Aliquots der ersten PCR mit den innen liegenden Primern angeschlossen.

4.3.3 Aufreinigung der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Bestandteile nach ihrer Größe aufzutrennen und darzustellen. Dies geschieht durch ein elektrisches Feld, das über ein als Molekularsieb wirkendes Agarosegel angelegt wird. Kleinere negativ geladene Moleküle wandern schneller als größere in Richtung der positiv geladenen Anode. Mit Hilfe eines zusätzlich aufgetragenen Markers kann die Größe der Banden abgelesen werden.

Zur Auftrennung der PCR Produkte wurde ein 1%iges Agarosegel in TAE-Puffer mit Ethidium-Bromid (0,5 µl/ml, Stammlösung 10 mg/ml) bzw. GelRed Nucleic Acid Stain verwendet (1:30000, 10000x in Wasser, Biotium, Wayward, USA). Dazu benötigt man für ein Gel in mittlerer Größe 1,6 g Agarose, welche in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und in 160 ml TAE-Puffer suspendiert wurde.

Der 10x TAE-Elektrophoresepuffer (pH 8,5) setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,4 M Tris-HCl (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- 10 mM Na₂EDTA (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,2 M Essigsäure (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)

Anschließend wurde die Lösung in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose im Puffer vollständig aufgelöst hatte. Nun wurden 9 µl Ethidiumbromid- bzw. GelRed-Stammlösung hinzugefügt und das flüssige Gel in eine Gelform gegossen, welche einen Kamm enthielt. Dieser formte kleine Taschen, in die später die PCR-Produkte eingefüllt wurden. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Gelelektrophoresewanne gegeben, welche mit TAE-Puffer gefüllt war. Nun wurden die Taschen mit den PCR-Produkten sowie einem Marker (GeneRuler 100 bp DNA Leiter, 0,1 µg/µl, Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland) beladen, welcher es ermöglichte, die Länge der DNA-Fragmente abzulesen. Nach

Elektrophorese (125 V) über einen Zeitraum von etwa 60 Min. wurden auf einem UV-Schirm die DNA-Banden betrachtet und fotografiert.

4.3.4 Gelextraktion

Die DNA-Banden mit der gewünschten Länge wurden nun mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Nucleic Acid Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) extrahiert.

4.3.5 Direkte Sequenzanalyse

Von der gewonnenen DNA werden nun 9 µl zusammen mit 1 µl Primer (Verdünnung 5 nmol/µl) auf eine 96-Well-Platte pipettiert und von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg direkt sequenziert. Nach Erhalt der Sequenzen wurden diese auf homo- und heterozygote Mutationen überprüft und mit den Datenbanksequenzen verglichen. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Bei nicht eindeutigen Ergebnissen oder einem Basenaustausch wurde auch der Gegenstrang mit dem Antisense-Primer sequenziert.

4.3.6 Restriktionsverdau und RFLP-Analyse

Um eine neu identifizierte Genvariante bzw. Mutation mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen wurde ein Restriktionsverdau bzw. eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse an der spezifischen Stelle angeschlossen. Hierzu wurde ein Restriktionsenzym verwendet, das an einer bestimmten Erkennungssequenz bindet und die DNA schneidet. Um beispielsweise ein mutiertes von einem Wildtyp-Allel zu unterscheiden, wählt man ein Restriktionsenzym, dessen Erkennungssequenz spezifisch im Bereich der mutierten Stelle liegt und diese in einem DNA-Fragment schneiden kann. In der Wildtyp-Situation lag in diesem Beispiel keine komplette Schnittstelle für das Restriktionsenzym vor, so dass ein PCR-Amplifikat nicht geschnitten werden konnte. Nach einem Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten erhielt man in der Gelelektrophorese bei der Person mit der Mutation eine Doppelbande, wenn die Mutation heterozygot vorlag, während Normalkontrollen nur eine einzelne größere Bande zeigten.

Für den Beweis einer bisher nicht beschriebenen Mutation im Gen *MYOT* (Myotilin) wurden für den Restriktionsverdau 50 µl PCR Produkt mit 5,5 µl Puffer 1 (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) und 1 µl Restriktionsenzym *HpyCH4IV* (NEB) über Nacht bei 37°C angesetzt und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Hier zeigte sich eine Doppelbande. Bei 50 Normalkontrollen, d. h. 100 Kontrollchromosomen und weiteren Personen eines Kontrollkollektivs konnte diese nicht nachgewiesen werden.

4.3.7 Mutagenese der Position VCP R159C im Exon 5 des VCP-Gens

Die Methode der ortsgerichteten Mutagenese ermöglicht es, einen DNA-Abschnitt an einer spezifischen Stelle experimentell zu modifizieren. Dazu sind zwei Primerpaare und vier PCR-Schritte erforderlich. Als Matrize diente ein Plasmid, das die cDNA-Sequenz des VCP-Wildtyps enthält. In den ersten beiden PCR Schritten wurden zwei sich überlappende Abschnitte um die Mutagenese-Stelle in zwei separaten PCRs amplifiziert. Einer der beiden Primer war ein Mismatch-Primer, welcher einen einzelnen Basenaustausch im PCR-Produkt zur Folge hatte. Für die PCRs wurden DNA-Polymerasen mit Proofreading-Funktion verwendet (PCR 1 und 2: Vent DNA Polymerase, NEB). Im nächsten Schritt wurden die beiden Produkte ohne Primer mit der AccuPrime *Pfx* DNA Polymerase (Life Technologies, Darmstadt) für 20 Zyklen vervielfältigt. Der vierte Schritt war eine PCR mit den beiden äußeren Primern und dem Produkt aus PCR 3. Die beiden äußeren Primer enthielten spezifische Schnittstellen, die von ausgewählten Restriktionsenzymen (*Sac*I und *Nhe*I) geschnitten werden konnten und somit auch das Produkt aus der vierten PCR. So konnte dieser amplifizierte DNA-Abschnitt nach geeignetem Restriktionsverdau in den Zielvektor ligiert werden.

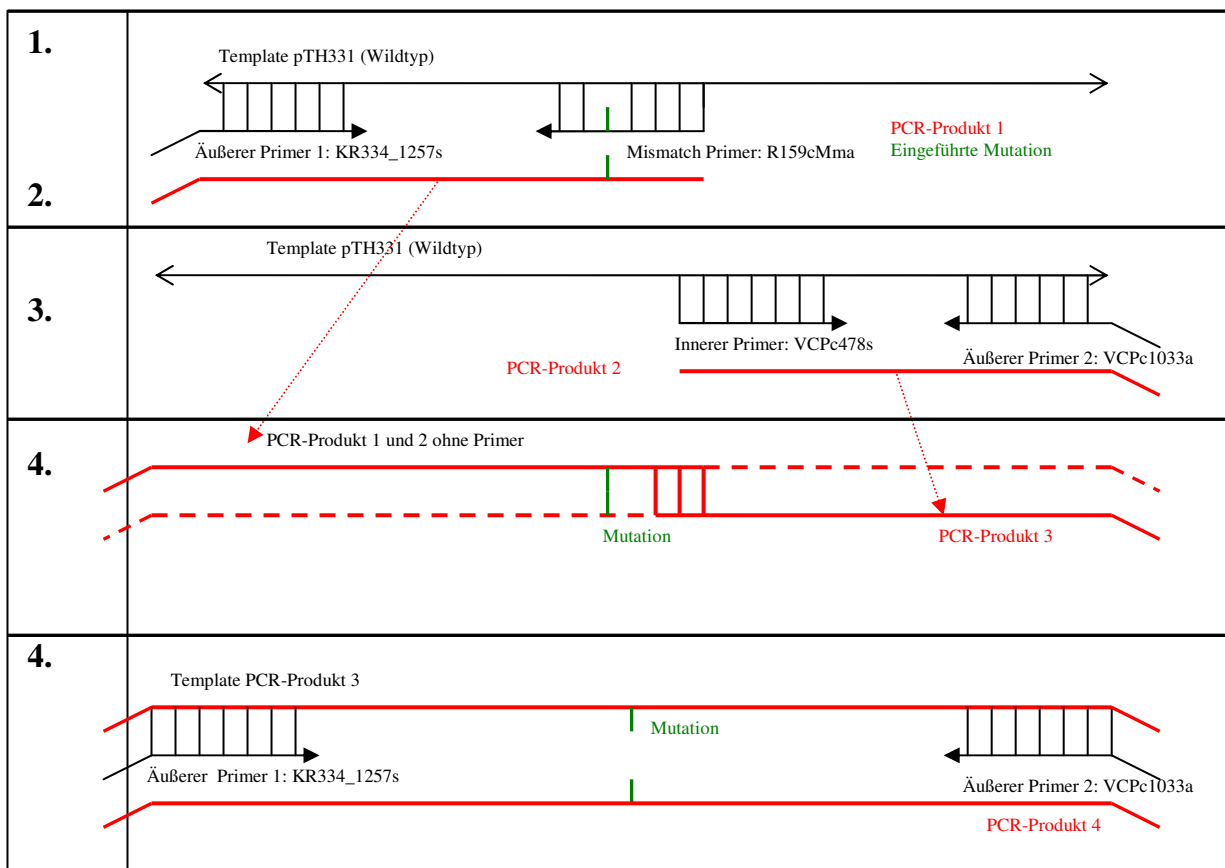


Abb. 7: Skizze der ortsgerichteten Mutagenese: Schematische Darstellung der 4 Amplifikationsschritte.

4.3.8 Klonierung – Einführung der Mutation VCP R159C in den Vektor pTH333

Um den veränderten DNA-Abschnitt für weitere Versuche verwenden zu können, musste er in eine Plasmid-DNA eingefügt werden. Dazu wurde sowohl das DNA-Fragment als auch das Zielploid mit identischen Restriktionsenzymen verdaut und diese nach Aufreinigung in einem weiteren Schritt mit Hilfe einer DNA-Ligase verbunden. In diesem Fall wurden je 2 µl der Restriktionsenzyme *SacI* und *NheI* verwendet, dazu 1 µl BSA (10 mg/ml), 5 µl NEB buffer 1 und 2 µl Plasmid-DNA bzw. 40 µl modifiziertes DNA-Fragment pipettiert und der Verdau über Nacht bei 37°C inkubiert.

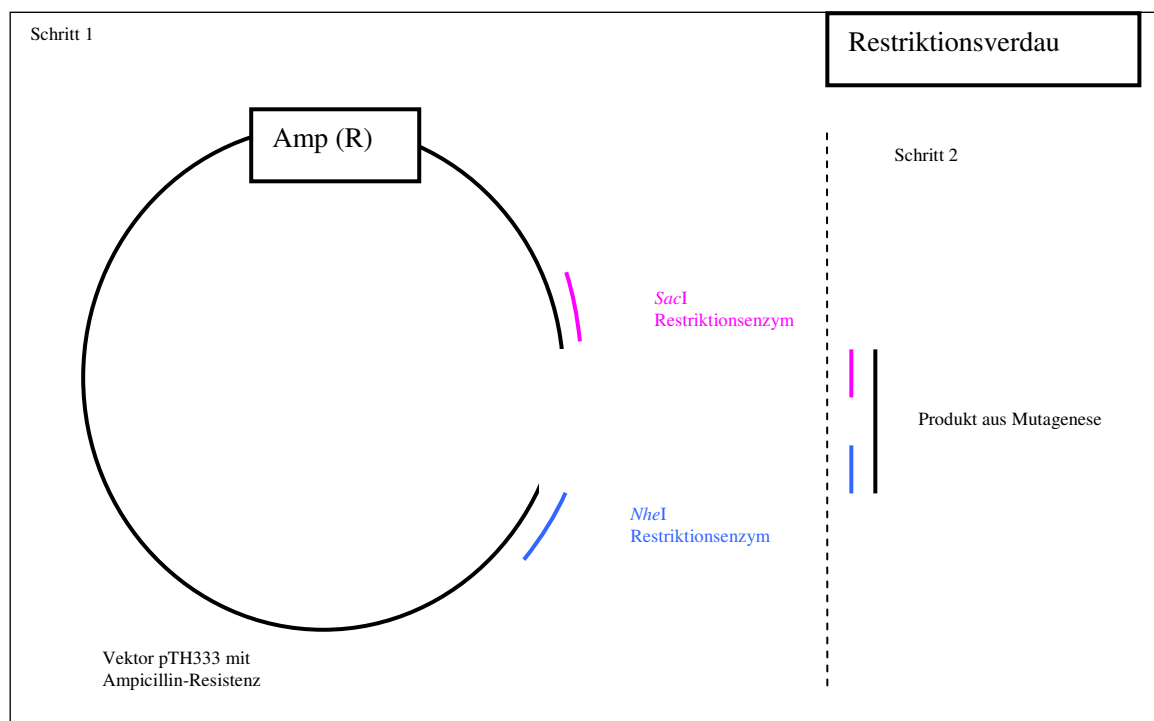
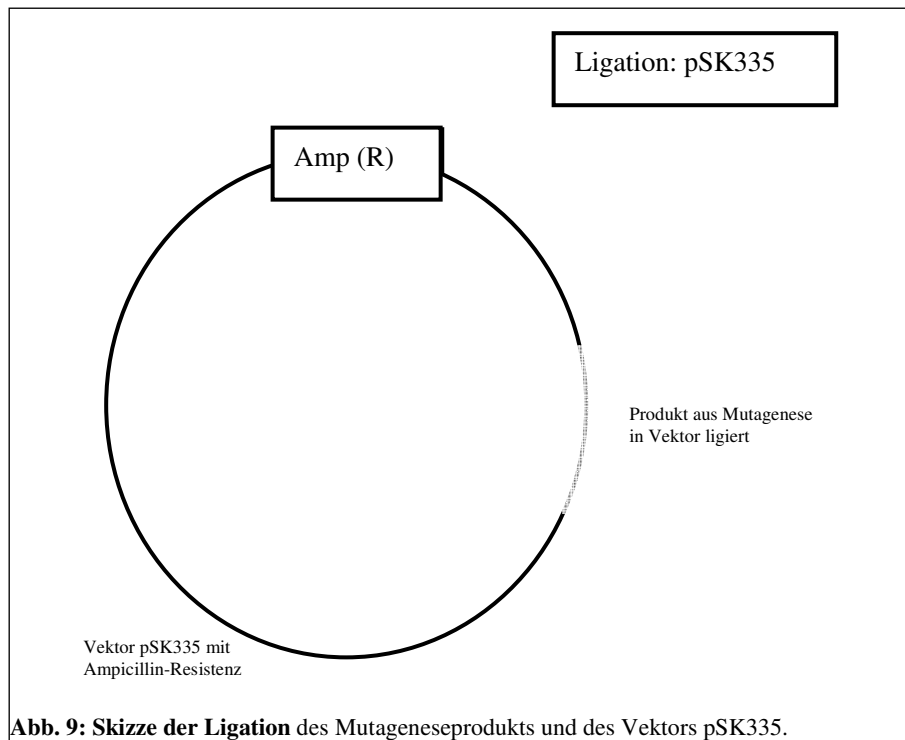


Abb. 8: Skizze des Restriktionsverdaus mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *NheI*.

Im darauffolgenden Schritt wurden der geschnittene Vektor und das Produkt nach Gelaufreinigung mit T4-DNA-Ligase ([Schroder, et al. 2003](#)) und 1x T4-Ligase Puffer über Nacht im Kühlraum bei ca. 7°C ligiert. Es resultierte das neue Vektorkonstrukt pSK335 mit der gewünschten Mutation. Dies wurde noch einmal mit Hilfe einer direkten Sequenzanalyse überprüft.



Schließlich wurde der Vektor pSK335 in kompetente One Shot®Top10 – Bakterienzellen (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit der Hitzeschockmethode transformiert. Auf LB (Luria-Bertani)-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und in LB-Flüssigmedium wurden die Bakterien kultiviert. Geringere Plasmid-DNA-Mengen wurden mit einer Standard-Miniprep-Methode extrahiert, größere Plasmid-DNA-Mengen mit einem Maxiprep gemäß den Angaben des Herstellers (NucleoBond® Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

4.3.9 Transfektion in PMI28-Zellen

Die verwendete Zelllinie waren Mausmyoblasten (PMI28-Zellen). Die Zellen wurden in Ham's F10 Medium mit 15% FCS gezüchtet und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Transfektion der Myoblasten mit dem Vektor pSK335 geschah mit Polyplus JetPEI-DNA Transfection Reagent (PepLab, Erlangen, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers.

4.3.10 Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Nach 1 - 5 Tagen wurden die Zellen mit 3,7% Paraformaldehyd (PFA, Stammlösung 7,4%) in 1x CSK-Puffer (2x CSK-Puffer: 200 mM NaCl, 600 mM Sucrose, 20 mM PIPES pH 6.8, 6 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) fixiert und mit anti-V5 rabbit (Rockland, Gilbertsville, USA), Verdünnung 1:4000 und anti-alpha-Actinin mouse (Sigma, Saint Louis, USA), Verdünnung 1:100 und den passenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt [Alexa

Fluor® 594 anti-rabbit (rot), Verdünnung 1:500 und Alexa Fluor® 488 anti-mouse (grün), Verdünnung 1:500, Life Technologies].

Die mikroskopischen Bilder wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop FluoView FV1000 (Olympus, Hamburg) erstellt.

4.3.11 Primer

GNE Primer

Acc.No. AL158830, gi 11121380, Chr. 9p12-p11

Primername	Primersequenz	Tm (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
A1s	5'-GCCTATTGGTGACTGCTCCGTGGCAGCTAA-3'	66.0	Exon 1	149
A1a	5'-TGAGAAGCAAGTAGCAGCCACAGAATGACT-3'	62.0		
2s	5'-GTGGTTAAGGACTTGAACT-3'	54.0	Exon 2	449
2a	5'-GTGACTACTCTAAGGCCAC-3'	56.7		
3s	5'-CTTCAGAGTTGGTGTAGATTG-3'	58.0	Exon 3	618
3a	5'-CCAAAAGGATTGAAATAGACGG-3'	58.0		
4s	5'-GCACAGACTTAGAGTCTTGC-3'	58.0	Exon 4	335
4a	5'-GAGCAAGATAGGAAGGCAG-3'	57.0		
5s	5'-GTGGGCTATACTTGCCAATG-3'	58.1	Exon 5	357
5a	5'-GCATACCTTATAACAACCTCACG-3'	58.0		
6s	5'-GGTCTAATTATGAGCATAGTAC-3'	54.9	Exon 6	269
6a	5'-GGATGATTAAACAGTGATTGTAG-3'	58.0		
7s	5'-CTGAAGTCTCAGTTTCCATTAC-3'	58.0	Exon 7	396
7a	5'-GTTTCTAGTCTTACCTTCCAAC-3'	62.0		
8s	5'-CTATAGCAGTGCTAATTTGTC-3'	59.0	Exon 8	308
8a	5'-GCTCAGGCATGCATCACAAG-3'	62.0		
9s	5'-CGTTTGTCTTAGGAGATCTGG-3'	56.6	Exon 9	424
9a	5'-GCAGAGTTGTAACCACCTGAC-3'	57.3		
10s	5'-CTCACATGCCAAAGCTCTGC-3'	62.1	Exon 10	372
10a	5'-GGCTTCAGTGTTTCAGCTGTC-3'	60.0		
11s	5'-GTGAAAAGAAAACACCGTCTTCC-3'	61.2	Exon 11	344
11a	5'-GACACTGCAAAGCACCTGTC-3'	59.5		
12s	5'-CTTTAACATTCTGCTGCTGGCTC-3'	64.0	Exon 12	461
12a	5'-ATTTCTCTGCCAAAGTCACCTGC-3'	63.0		

VCP Primer

Acc. No. AC004472, gi 2984582, Chr. 9p13-p12

Primername	Primersequenz	Tm (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
1s	5'-ATTGGCTGTGATCTGCGGGTTGC-3'	66.0	Exon 1	706
1a	5'-TCCGTCTTAAGGGAGCCAATCG-3'	64.0		
2s	5'-GGGACAGCTTCATCTATTCAGTGTTC-3'	62.0	Exon 2	441
2a	5'-GTCACCTCGGAACAACGTCAATTCATC-3'	68.0		
3s	5'-ACAGTGTTGGTGTCTTGTCCAGGTAA-3'	60.5	Exon 3	473
3a	5'-GGTCCTGCCTGTAATACATGGGTCCTG-3'	68.0		
4s	5'-TCCACCTGTCTCTTCTCTCTTC-3'	69.0	Exon 4	360
4a	5'-GATAAAGATGTTCCAAGGTTTATTCC-3'	64.0		
5s	5'-GCCGAGCACCCAGTCCTGACAGTTAC-3'	71.7	Exon 5	324
5a	5'-AGGGCACTATCTAATGAGCTTGGC-3'	64.0		

6s	5'-GTGGAATGATTAGAGAACTCAGC-3'	63.3	Exon 6	302
6a	5'-CATGCATGAAAACAGTCCCAGG-3'	62.0		
7s	5'-AAGTTGCAATCATAAATGTTGCC-3'	58.0	Exon 7	401
7a	5'-ATAAGTGCTCCAGCTCATAAGCC-3'	63.0		
8s	5'-TTCTCTCCAGCCTTGCCTGGTGGCTGT-3'	71.0	Exon 8	535
8a	5'-AAATCGCCGTAGAGCTGGGTCAATGC-3'	66.4		
9s	5'-CAACGTTCTGTAAAGCCTTTGAGGAGGCT-3'	66.6	Exon 9	644
9a	5'-TCAAAGCGACCTGTGGGACAGTACACAA-3'	66.6		
10s	5'-TAATCCTCTTGAAGCCCTTCACAGTGATTG-3'	60.0	Exon 10	596
10a	5'-TTGGGACCTAGAAATAAGGCTGCTCCAAC-3'	70.0		
11-12s	5'-CAGCCTTATTCTAGGTCCCAAGTC-3'	62.6	Exon 11+12	656
11-12a	5'-TGCAGCAAATGTGTTGACACCTG-3'	69.4		
13s	5'-ATCTGATACCATTTGGGTACACC-3'	57.7	Exon 13	482
13a	5'-AATAACACTAGGTCTCTCAGACCTC-3'	56.5		
14s	5'-AATTCTACCTTCCCTTTAGACCAAC-3'	63.0	Exon 14	408
14a	5'-GCTATTCTTTGATGAGCTGGATTG-3'	57.0		
15s	5'-CTGGTACGGAGTGCTCTTTAGTTTC-3'	66.0	Exon 15	476
15a	5'-TTCCAACAGCTTCTACTCTCAACTC-3'	64.0		
16-17s	5'-AGGAGACCAATAAACTGCAGTAATG-3'	63.0	Exon 16+17	865
16-17a	5'-AGCATTGAGTCAAGTGCAGATGC-3'	63.0		

Vimentin Primer

Acc. No. NM 003380, NC 000010, gi 240849334, Chr. 10p13

Primername	Primersequenz	Tm (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
2_1forward	5'-CTCCGCGGCTGGGATGGCAGTG-3'	71.0	Exon 2_1	542
2_1reverse	5'-CCACCTTCTCGTTGGTGGGGTG -3'	70.0		
2_2s neu	5'-CTGCAGGACTCGGTGGAC-3'	61.0	Exon 2_2	419
2_2a neu	5'-AGGGCGTGGCAGCTCTC-3'	60.0		
3s	5'-GAATACGTGGTGTTTGGGTGTG-3'	62.0	Exon 3	480
3a	5'-TTTCTTTATGTCCCAAGGAAGTG-3'	60.0		
3forw	5'-GGCGCTAGTTGCGCGGAGGT-3'	62.0		
3reverse	5'-CGCGCAGCCCTGAAGTTTGCAGT-3'	62.0		
4-5s	5'-ATAGTAAGGAGACTAGGTTTCAGATGG-3'	58.0	Exon 4-5	627
4-5a	5'-ATAAATAAAGGAGGTGATGTGAGTGG-3'	61.0		
6s	5'-CAGAAATTTAAACCTATACTGGAAGAC-3'	57.0	Exon 6	406
6a	5'-TTCAAGAGTTCCATGAAGTCCC-3'	60.0		
7s	5'-TATTGCAGAAGGTCTGTAAATGGTTC-3'	62.0	Exon 7	459
7a	5'-TCTCTCAATTCAAATTCCTCTCTAC-3'	60.0		
8s	5'-AGTGTGTTAATTGTTCCTCAGTG-3'	58.0	Exon 8	343
8a	5'-ATCAGGATGAGATAGTACTTGCAGC-3'	60.0		
9s	5'-TAGTACTTTACACAATTGCCCTCTCCC-3'	61.0	Exon 9	331
9a	5'-TAGTAGGCATGAATGAAACCTGAAC-3'	61.0		
10s	5'-AGAAGCAACATAACCTTCTGATTG-3'	60.0	Exon 10	302
10a	5'-CTATTCCAAATCTATCTTGCCTC-3'	61.0		

Primer für die ortsgerichtete Mutagenese

Primername	Primersequenz	Tm (°C)	Zielregion	Fragmentlänge (bp)
KR 334_1257s	5'-TGCGTGAGCGGAAAGATG-3'	56.0		1003 bp
R159c MMa	5'-CACCACCTTTGAACTCCACAGCACATCCCACCACGG -3'	80.0		
VCPc478s	5'-GTGCTGTGGAGTTCAAAGTGGTGGAAC-3'	70.0		169bp
VCPc1033a	5'-TGAGCTAGCTGCTTCTCTGC -3'	59.0		

5 ERGEBNISSE

Um eine krankheitsverursachende genetische Veränderung zu identifizieren und eine eindeutigere Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bei der heterogenen Gruppe von Patienten mit hereditären Einschlusskörpermyopathien herstellen zu können wurden bei insgesamt 42 Patienten molekulargenetische Analysen durchgeführt. Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten nach ausführlicher Aufklärung und mit schriftlichem Einverständnis der Patienten nach Gendiagnostikgesetz (GenDG) §§ 8, 9.

Die klinische und muskelbiopsische diagnostische Einordnung in die Gruppe der hereditären Einschlusskörpermyopathien (IBM) oder Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMD) geschah bereits vorab im Friedrich-Baur-Institut, Neurologische Klinik und Poliklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, oder in externen Kliniken. Auf die Verdachtsdiagnose LGMD1A und IBMPFD hin wurden insbesondere die Gene *VCP* und *MYOT* auf Mutationen untersucht. Bei zwei Patienten wurde dabei eine seltene Mutation im *VCP*-Gen identifiziert, welche weiters in funktionellen Analysen im Zellkulturmodell untersucht wurde.

Bei einer klinisch sehr schweren Verlaufsform der seltenen dominanten LGMD1A wurde bestätigt, dass ein neu identifizierter Basenaustausch im *MYOT*-Gen, der innerhalb der betroffenen Familie mit dem klinischen Phänotyp segregierte, nicht in Kontrollpopulationen ohne neuromuskuläre Erkrankungen vorkommt. Die Pathogenität dieser neuen genetischen Veränderung, die zu einem Aminosäureaustausch führt, wurde zusätzlich durch verschiedene bioinformatische Vorhersagealgorithmen und die phylogenetische Konservierung des entsprechenden Aminosäurerests unterstützt.

Um mögliche neue genetische Veränderungen in der heterogenen Gruppe der hereditären Einschlusskörpermyopathien erstmals zu identifizieren, wurde das neue Kandidatengen Vimentin ausgewählt und die kodierenden Bereiche einschließlich angrenzender intronischer Sequenzen bei einem Patientenkollektiv mit 28 Patienten direkt sequenziert. Dieses Gen kodiert für das gleichnamige Protein, welches ein Typ-III-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine ist. Vimentin findet sich histochemisch und proteinanalytisch in pathologischen Proteinablagerungen bei myofibrillären Myopathien ([Ferrer and Olive 2008](#)). Bei einer Reihe von hereditären Proteinaggregatmyopathien finden sich die krankheitsassoziierten mutierten Proteine in den pathologischen Ablagerungen in Muskelfasern. Es wurde allerdings bisher noch kein Zusammenhang zwischen oben genannten Krankheiten und Mutationen im Vimentin-Gen

in der Literatur beschrieben, so dass Vimentin als interessantes neues Kandidatengen bei Patienten mit bislang fehlender diagnostischer Zuordnung zu einer der bekannten Aggregatmyopathien in Frage kam.

5.1 Analyse des *VCP*-Gens

Das *VCP* (Valosin-Containing-Protein)-Gen umfasst 17 Exons. Eine dominante Mutation in diesem Gen ist ursächlich für die IBMPFD. Besonders häufig finden sich Veränderungen in den Exons 3, 5 und 6, den sogenannten „hot spot“ Regionen. Bei der molekulargenetischen Untersuchung von 11 Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer IBMPFD wurde bei einem Patienten die Mutation R159C im Exon 5 identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch führt und in der Literatur bereits vorbeschrieben ist ([Bersano et al. 2009](#)). Um detailliertere Hinweise zu dem zugrunde liegenden Pathomechanismus zu bekommen, wurde die Klinik des Patienten genau evaluiert und mit einem anderen Patienten mit derselben Mutation verglichen. Anschließend wurde die Mutation funktionell im Zellkulturmodell charakterisiert.

5.1.1 Klinische Analyse und Vergleich zweier Patienten mit der Mutation R159C

Beim **Patienten A** handelte es sich um einen heute 65-jährigen Patienten, der sich im Alter von 61 Jahren erstmals vorstellte. Hauptsymptome waren Gangstörungen und progrediente rechtsbetonte proximale und distale Beinparesen, die sich vorwiegend beim Treppensteigen, später aber auch beim normalen Gehen bemerkbar machten und seit etwa 5 Jahren bestanden. An der oberen Extremität hatte der Patient ebenfalls proximale Paresen, so dass eine Armelevation über 90° nicht möglich war. Vier Jahre zuvor war der Patient mit einem Rollator versorgt worden, mit welchem ihm ca. 15-minütiges Gehen in der Ebene möglich war. Nach der Bewegung traten lumbosakrale Schmerzen mit Ausstrahlung in beide Oberschenkel auf. Bei vermehrter Bauchpresse litt der Patient an geringfügiger Stuhlinkontinenz. An weiteren relevanten Nebendiagnosen war im Alter von 60 Jahren ein Morbus Paget mit degenerativen Wirbelsäulenveränderungen diagnostiziert worden. In der Blutgasanalyse zeigte sich ein pH-Wert von 7,42, ein pCO₂ von 49,4 mm Hg und ein pO₂ von 50,7 mm Hg, entsprechend einer respiratorischen Globalinsuffizienz. Zusätzlich lag eine leichte Obstruktion und Restriktion und eine mäßige Einschränkung der Diffusionskapazität vor.

Bei der kardiologischen Untersuchung war bei einer Adipositas permagna mit einem BMI von 41,8 kg/m² mittels transthorakaler Echokardiographie eine Aussage über die Herzleistung nahezu unmöglich. Lediglich ein etwas vergrößerter linker Vorhof konnte diagnostiziert werden. Im

EKG konnte ein abgelaufener Myokardinfarkt nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei deutlichen Beinödemen lag der Verdacht einer Herzinsuffizienz nahe.

In der klinisch-neurologischen Untersuchung war das Gehen ohne Hilfe nicht möglich, ein Trendelenburg'sches Gangbild zeigt sich auf beiden Seiten. Zehengang und Fersenstand waren beidseits nicht möglich. Der Achillessehnenreflex war beidseits erloschen und der Patellarsehnenreflex sowie die Armeigenreflexe nur schwach auslösbar, pathologische Reflexe wurden nicht beobachtet. Bei der manuellen Kraftgradprüfung (Kraftgrade nach MRC, Medical Research Council) waren besonders auffällig: Hüftbeuger rechts 2/5, links 3/5. Hüftstreckung rechts 2/5, links 4/5. Kniestreckung rechts 2/5, links 5/5. Fußheber beidseits 2/5. Es fanden sich keine Sensibilitätsstörungen.

In der neurophysiologischen Untersuchung zeigte sich im EMG in keinem der untersuchten Muskeln eine pathologische Spontanaktivität, allerdings in der proximalen Armmuskulatur ein ausgeprägt chronisch-neurogener Umbau, in der proximalen Beinmuskulatur eine Mischung aus überwiegend neurogenen, herdförmig auch myopathischen Veränderungen.

Eine MRT der Oberschenkelmuskulatur zeigte eine beidseitige fettige Degeneration, am deutlichsten in den Extensoren. Die Laborwerte zeigten eine leicht erhöhte CK bei 206 U/l (Norm <190 U/l).

Beim **Patienten B** handelte es sich um einen 69-jährigen Mann, der sich mit einer seit 10 Jahren progredient verschlechternden proximal-betonten Muskelschwäche vorstellte. Neben der Schwäche zeigte sich seit einigen Jahren auch eine Muskelatrophie der Oberarme, Oberschenkel, Hüften und Waden. Aufstehen aus der Hocke war deutlich erschwert, ebenso Treppensteigen, welches nur mit Gowers-Manöver möglich war. Dennoch präsentierte sich ein sportlicher Patient, der noch Joggen und Radfahren konnte. Der Patient berichtete über keine respiratorischen Einschränkungen. Familienanamnestisch gab es keinen Hinweis auf neuromuskuläre Erkrankungen. In der kardiologischen Diagnostik wurden eine diastolische Funktionsstörung sowie Sinusarrhythmien und supraventrikuläre Tachykardien im Langzeit-EKG festgestellt. In der Bildgebung zeigte sich kein Hinweis auf eine Störung des Knochenstoffwechsels im Sinne eines M. Pagets.

In der klinisch-neurologischen Untersuchung war die Gangprüfung unauffällig, ein Aufstehen aus der Hocke nicht möglich, das Trendelenburg-Zeichen rechts positiv und der Fersenstand leichtgradig eingeschränkt. Es fielen symmetrische Atrophien der dorsalen Schultergürtelmuskulatur, der Oberarme, der Handbeuger, des M. quadriceps femoris und des medialen Kopfs des M. gastrocnemius auf. Die Muskeldehnungsreflexe an der oberen und unteren Extremität waren seitengleich mittellebhaft auslösbar.

	Patient A	Patient B
Krankheitsbeginn	56 Jahre	59 Jahre
Klinische Symptome	Gangstörungen, progrediente proximale und distale Beinpareesen	Langsam progrediente proximal betonte Muskelschwäche, rezidivierende Stürze, Muskelatrophie der Oberarme, Oberschenkel, Hüftmuskeln und Waden, erschwertes Treppensteigen
Relevante Nebendiagnosen	M. Paget mit degenerativen Wirbelsäulenveränderungen Respiratorische Globalinsuffizienz bei COPD V.a. Herzinsuffizienz	Diskrete axonale Neuropathie (klinisch asymptomatisch)
Körperliche Untersuchungsergebnisse	Gehen ohne Hilfe nicht möglich, Trendelenburg'sches Gangbild, Zehengang/Fersengang nicht möglich, Achillessehnenreflex nicht auslösbar, abgeschwächte Reflexe d. Patellarsehnen- und Armreflexe, keine pathologischen Reflexe. Kraftgrade: Hüftbeuger und strecker 2/5-3/5, Kniestreckung rechts 2/5, links 5/5, Fußheber 2/5, Armmuskulatur minimal 4/5, keine Sensibilitätsstörungen	Gangprüfung unauffällig, Trendelenburg-Zeichen rechts positiv, Fersenstand leichtgradig eingeschränkt, rechtsbetont, Muskeldehnungsreflexe an oberer und unterer Extremität seitengleich mittellebhaft auslösbar, Patellarsehnenreflex beidseits abgeschwächt, keine pathologischen Reflexe. Kraftgrade: obere Extremität 4/5, Hüftbeuger links 4/5, rechts 3/5, ischiocrurale Muskulatur rechts 4-5/5, links 4/5. Muskelatrophien der Schultermuskulatur dorsal der Oberarme, Handbeuger, M. quadriceps femoris und medialer Kopf der Wadenmuskulatur, keine Sensibilitätsstörungen
Apparative Untersuchungsergebnisse	<u>EMG</u> : keine pathologische Spontanaktivität, chronisch neurogener Umbau der proximalen Armmuskeln, neurogene und myopathische Veränderungen in den proximalen Beinmuskeln <u>MRT</u> : fettige Degeneration der betroffenen Muskelgruppen <u>Labor</u> : milde CK-Erhöhung auf 206 U/l	<u>EMG</u> : pathologische Spontanaktivität im M. biceps brachii, im M. tibialis anterior rechts und im M. gastrocnemius beidseits <u>ENG</u> : Nachweis einer diskreten axonalen Neuropathie <u>MRT</u> : ausgeprägte, fächerförmige Signalanhebungen der medialen und dorsalen Oberschenkelmuskeln im Sinne eines Muskelödems, lipomatöser Umbau besonders des M. adductor magnus rechts, des M. semitendinosus beidseits und des M. vastus lateralis links <u>Labor</u> : milde CK-Erhöhung auf 307 U/l (Normalwert <190 U/l)
Muskelbiopsieergebnisse	Bild einer Einschlusskörpermyopathie mit einzelnen „rimmed vacuoles“ und autophagischen Vakuolen. Feinstrukturell regressive Faserveränderungen mit granulomatösen Ablagerungen ohne Nachweis von Filamenten	Bild einer degenerativen Myopathie mit „rimmed vacuoles“. Nachweis eines vaskulitischen Infiltrates. In der elektronenmikroskopischen Ansicht autophagische Vakuolen, typisches filamentäres Material. Immunhistochemisch keine relevante Hochregulation von MHC1-Klassenmolekülen, kein Nachweis von B-Zellen, minimal Makrophagen, kein Nachweis von CD4- oder CD8-positiven Lymphozyten oder ausgeprägte Komplementvermehrung. Kein Nachweis einer Vaskulitis.
Molekulargenetische Analyseergebnisse	Mutation p. Arg159Cys (R159C) (c. 475C>T)	Mutation p. Arg159Cys (R159C) (c. 475C>T)

Tabelle 2: Vergleich der klinischen Präsentation von Patient A und B mit einer Mutation im *VCP/p97*-Gen an der identischen Stelle p.R159C (c.475C>T).

Die Muskeldehnungsreflexe waren an der oberen und unteren Extremität seitengleich mittellebhaft auslösbar. Der Patellarsehnenreflex fand sich auf beiden Seiten abgeschwächt. Pathologische Reflexe konnten nicht ausgelöst werden. Bei der manuellen Kraftgradprüfung (Kraftgrade nach MRC, Medical Research Council) waren besonders auffällig: M. iliopsoas rechts 3/5, links 4/5, Außenrotation der oberen Extremität 3/5 beidseits. Es fanden sich keine Sensibilitätsstörungen. In der Elektroneurographie war eine axonale Neuropathie nachweisbar, die sich jedoch klinisch asymptomatisch präsentierte. Die Elektromyographie zeigte im rechten M. biceps brachii, im rechten M. tibialis anterior und im M. gastrocnemius beidseits eine pathologische Spontanaktivität mit teils neurogenen, teils myopathisch generierten Aktionspotenzialen. In der MRT-Untersuchung der Oberschenkelmuskeln wurden ausgeprägte, flächige Signalanhebungen beidseits im Sinne eines deutlichen Muskelödems beschrieben, außerdem lipomatöse Veränderungen einzelner Muskelgruppen, hier insbesondere des M. adductor magnus rechts, des M. semitendinosus beidseits und des linken M. vastus lateralis. Im Labor war der Serum-CK-Wert auf 278 U/l bei einem Referenzwert von <190 U/l leicht erhöht.

5.1.2 Histopathologische Analyse

In der Muskelbiopsie des linken M. vastus lateralis des **Patienten A** fand sich mikroskopisch das Bild einer Einschlusskörpermyopathie mit einzelnen „rimmed vacuoles“ und autophagischen Vakuolen in großen Einzelfasern. Die Muskelfasern waren sehr variabel in ihrem Durchmesser, es konnte keine wesentliche Entzündungsreaktion im Muskel festgestellt werden. Es zeigten sich angulär-atrophe eingelagerte und kleine abgerundete Fasern in nahezu allen angeschnittenen Faszikeln neben normal großen oder hypertrophen polygonalen Fasern. Es fanden sich keine Hinweise auf eine myofibrilläre Myopathie. Eine subsarkolemmale Mitochondrienakzentuierung und einige rimmed und autophagische Vakuolen konnten in der Trichromfärbung gezeigt werden. Hierbei handelt es sich um eine Färbung, mit der das intermyofibrilläre Netzwerk besonders gut zur Darstellung kommt.

In der Elektronenmikroskopie zeigten sich granulomatöse Ablagerungen und regressive Faserveränderungen ohne Nachweis von Filamenten. Diese Befunde alleine beweisen keine Einschlusskörpermyopathie, sondern lassen auch noch weitere Differenzialdiagnosen zu.

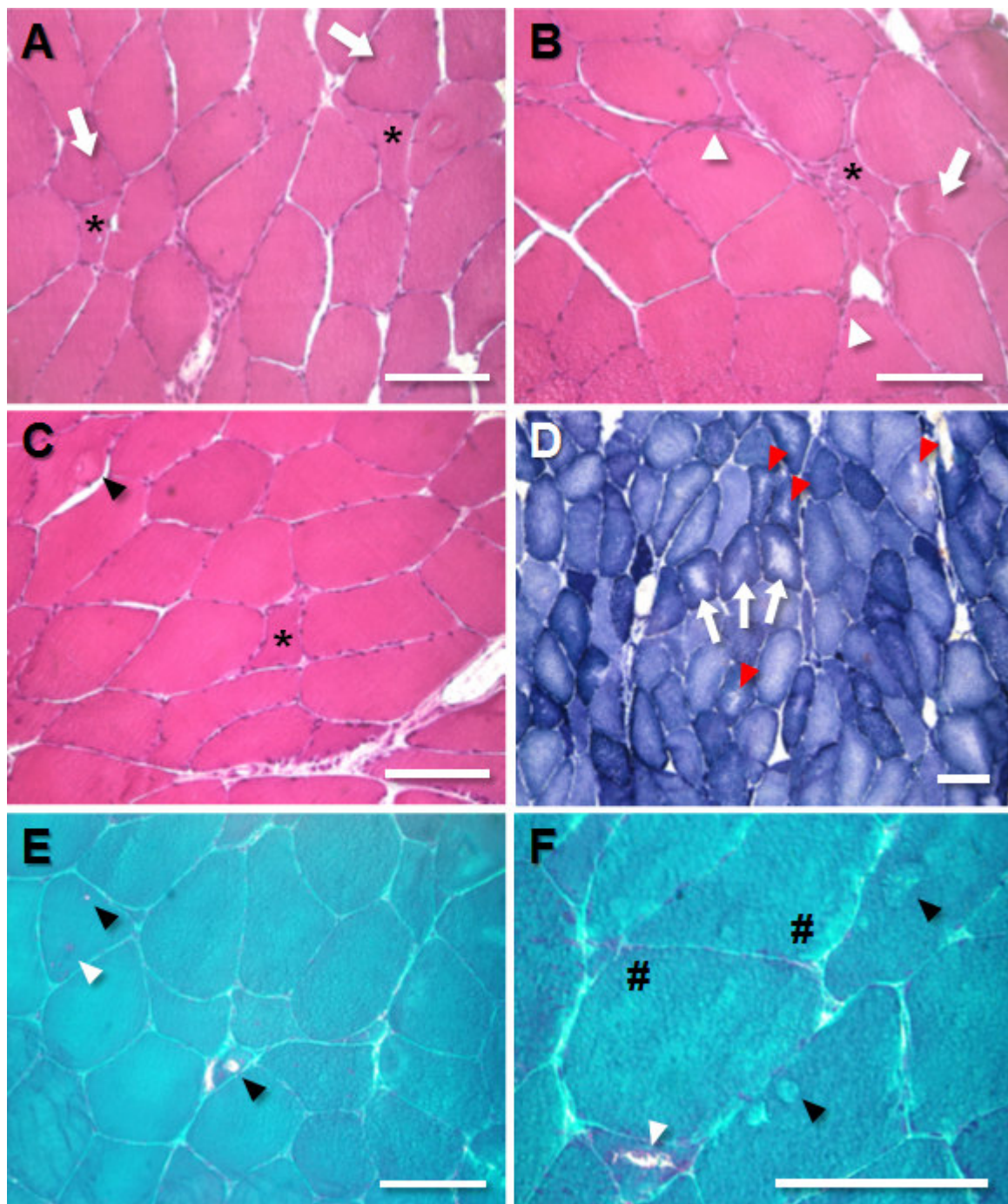


Abb. 10: Histologische Aufarbeitung von Transversalschnitten aus der Muskelbiopsie des M. vastus lateralis des IBMPFD-Patienten A mit einer R159C-Mutation im VCP-Gen.

A – C H&E (Haematoxylin-Eosin)-Färbung: Die im Querschnitt getroffenen Muskelfasern zeigen eine ausgeprägte Faserkalibervariabilitätserhöhung. Neben normal großen, zum Teil hypertrophen Fasern, die polygonal konfiguriert sind, finden sich angular-atrophe eingelagerte (*) und kleine abgerundete Fasern. Einzelne Myophagozytosen (weiße Pfeilspitzen) sind ebenfalls nachweisbar, darüber besteht keine wesentliche Entzündungsreaktion. In Einzelfasern, insbesondere in großen Fasern, finden sich kleine autophagische Vakuolen (weiße Pfeile), an einer Stelle in **C** eine typische rimmed vacuole.

D Die NADH-TR (Nicotinamid-Adenindinukleotid Tetrazolium-Reduktase)-Färbung zeigt u.a. einzelne große core-artige Veränderungen in Typ-I-Fasern (rote Pfeilspitzen) sowie typische dark blue fibres und Mottenfraßnekrosen (weiße Pfeile).

E, F In der Gomori-Trichrom-Färbung zeigt sich eine geringgradige subsarcolemmale Mitochondrienakzentuierung (# in **F**); auch hier werden wenige einzelne rimmed (schwarze Pfeilspitzen) und autophagische Vakuolen, teils mit rot angefärbtem, amorphem Material nachgewiesen (weiße Pfeilspitzen), das für eine Einschlusskörpermyopathie charakteristisch ist. Die mitochondrialen Veränderungen sind am ehesten nur sekundär einzuordnen. Massstabsbalken: 20 µm.

Beim **Patienten B** zeigte sich in der Muskelbiopsie des linken M. biceps brachii das mikroskopische Bild einer degenerativen Myopathie mit „rimmed vacuoles“. Der Muskel hatte vermehrt endo- und perimysiales Binde- oder Fettgewebe und eine erhöhte Faserkalibervariabilität. Des Weiteren gelang der Nachweis von atrophierten und abgeplatteten und angulär-atrophen Muskelfasern.

In normal großen wie auch in atrophierten Fasern wurden typische „rimmed vacuoles“ nachgewiesen. Es konnten keine entzündlichen Veränderungen identifiziert werden. In der Trichromfärbung bestätigte sich die Aggregatpathologie. Im Semidünnschnitt zeigten sich vermehrt Fasern mit Myelinfiguren und Vakuolen.

In der Elektronenmikroskopie wurde typisches filamentäres Material in großen Myelinfiguren nachgewiesen. Die Mitochondrien erschienen überwiegend normal ohne vermehrte Glykogeneinlagerung. Die Befunde waren insgesamt gut mit der Diagnose einer Einschlusskörpermyopathie vereinbar.

5.1.3 Molekulargenetische Analyse

Aufgrund der speziellen klinischen Symptomatik des **Patienten A** in Form einer langsam progredienten Myopathie assoziiert mit einem M. Paget und des **Patienten B** mit einer ähnlichen Symptomatik mit fehlender Knochenbeteiligung lag die Verdachtsdiagnose einer hereditären Einschlusskörpermyopathie auf der Grundlage einer *VCP*-Genmutation nahe.

Dazu wurden die Exons 2 bis 17 des *VCP*-Gens mittels PCR amplifiziert, aufgereinigt, direkt sequenziert und ein heterozygoter Basenaustausch (c.687C>T) in Exon 5 festgestellt, der zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein im Codon 159 führt (R159C). In der Abbildung 10 sind Elektropherogramm-Ausschnitte der entsprechenden Sequenzen des **Patienten A** und einer gesunden Normalkontrolle gezeigt.

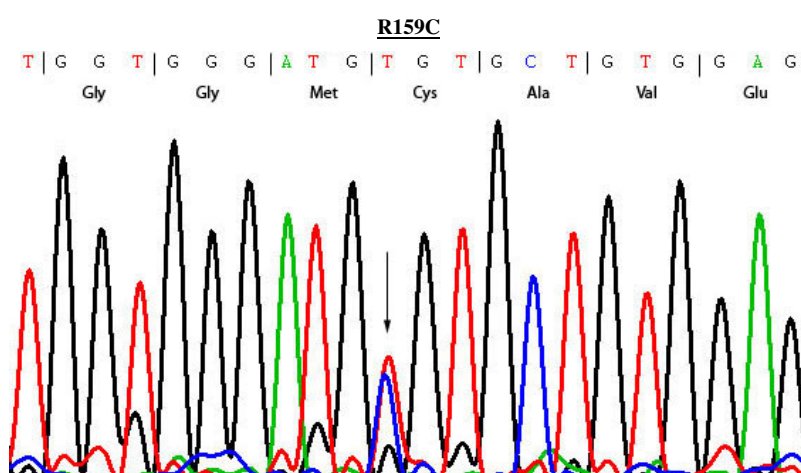
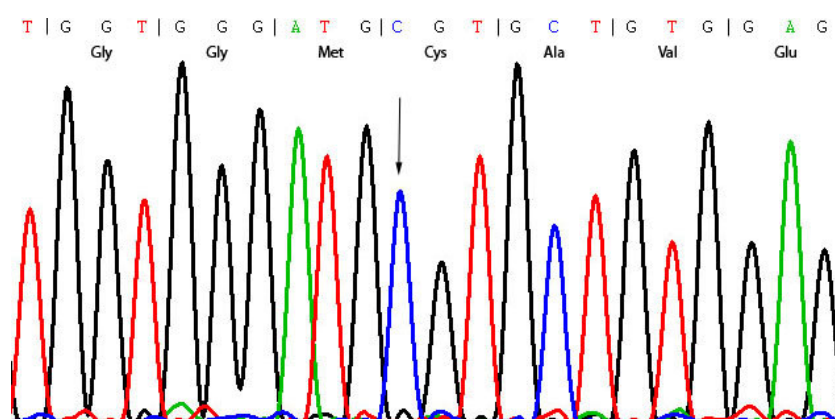
A**B**

Abb. 11: Ausschnitt der Elektropherogramme von Exon 5 des VCP-Gens: A Sequenz des Patienten mit der heterozygot vorliegenden Mutation R159C. Es zeigt sich ein heterozygoter einzelner Basenaustausch c.687 C>T. B Die molekulargenetische Analyse einer gesunden Kontrollperson zeigt die Wildtypsequenz.

Wie der Vergleich mit bereits publizierten Mutationen im VCP-Gen zeigt, handelt es sich hierbei um einen Mutations-Hotspot (Abb. 11).

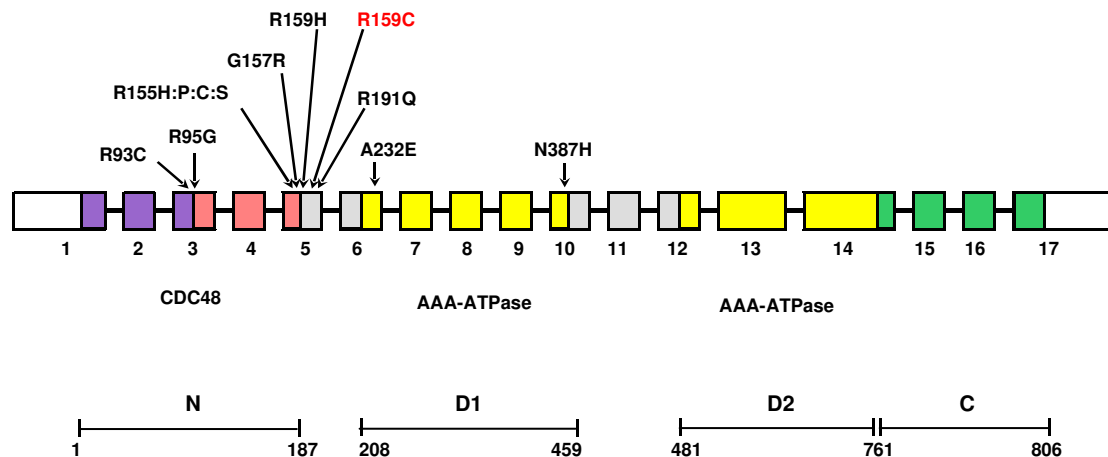


Abb 12: VCP-Gen mit Dömänen- und Exon/Intronstruktur und Kennzeichnung der häufigsten Mutationen. Die in dieser Arbeit identifizierte Mutation R159C im Exon 5 ist rot hervorgehoben. Die Länge der Introns ist verkürzt dargestellt.

Es ist davon auszugehen, dass die Mutation in ursächlichem Zusammenhang mit der Muskelerkrankung der beiden Patienten steht. Auf molekularer Ebene kann der pathogene Aminosäureaustausch dazu führen, dass eine übergeordnete β -Faltblattstruktur (β -barrel) der Ubiquitinbindungsdomäne von VCP zerstört wird, welche im Ubiquitin/Proteasom-System eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Bersano und Mitarbeiter berichteten, dass diese Mutation bei 150 italienischen Normalkontrollen ausgeschlossen werden konnte. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels direkter Sequenzierung bestätigt, dass sich bei 100 Kontrollchromsomen lediglich die Wildtypsequenz im Exon 5 fand, was die Pathogenität der R159C-Mutation nahelegt.

Die VCP-Mutation R159C betrifft Aminosäuresequenzen, die entwicklungsgeschichtlich hochgradig konserviert sind ([Bersano, et al. 2009](#)). Eine Mutation in einer hochkonservierten Sequenz ist mit höherer Wahrscheinlichkeit als pathogen einzustufen. Um zu bestimmen, wie konserviert eine DNA-Sequenz ist, wird die Aminosäureabfolge in der Umgebung der Aminosäurevariante in homologen Proteinen bei verschiedenen Organismen verglichen. Besteht eine hohe Übereinstimmung auch zwischen weit verwandten Spezies, ist davon auszugehen, dass die Sequenz evolutionär eine hohe Relevanz für die Funktion des betroffenen Proteins hat. In Tabelle 3 wird erkennbar, dass die Position R159C speziesübergreifend phylogenetisch hochkonserviert ist.

R159C

<i>Homo sapiens</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
Patient	L	V	R	G	G	M	C	A	V	E	F	K
<i>Pan troglodytes</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Mus musculus</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Rattus norvegicus</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Bos taurus</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Canis familiaris</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Monodelphis domestica</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Gallus gallus</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Xenopus laevis</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Danio rerio</i>	L	V	R	G	G	M	R	A	V	E	F	K
<i>Drosophila melanogaster</i>		V	R	A	A	M	R	P	I	E	F	K
<i>Caenorhabditis elegans</i>		V	Q	A	A	M	R	T	V	E	F	K
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		V	R	G	G	M	R	Q	V	E	F	K
<i>Oryza sativa</i>	L	V	R	G	G	M	R	S	V	E	F	K

Tabelle 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen der VCP-Homologen bei verschiedenen Spezies um die mutierte Position.

Der Argininrest an Position 159 (R159) ist phylogenetisch hochkonserviert. Abweichungen sind gelb markiert.

5.1.4 Funktionelle Analyse der Mutation R159C im VCP-Gen

Die Mutation ist innerhalb eines Mutations- Hotspots in der CDC48 Region im VCP-Gen lokalisiert. Es wird angenommen, dass durch den Aminosäureaustausch in der N-terminalen Domäne die Bildung der β -Faltblattstruktur der Ubiquitinbindungsdomäne vermindert oder aufgehoben ist, welche offenbar eine wichtige Funktion im Ubiquitin/Proteasom-Abbausystem innehat. Der gestörte Proteinabbau führt seinerseits zu einer pathologischen Akkumulation ubiquitinierten Proteine. ([Dai and Li 2001](#)).

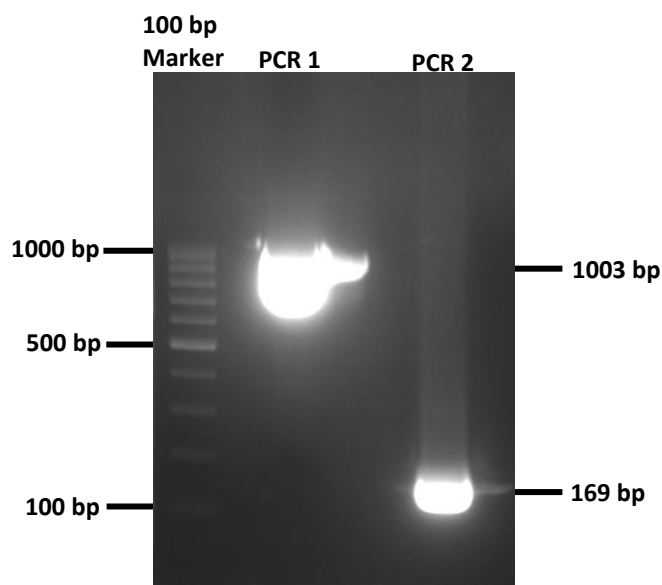


Abb. 13: Ortsgerichtete Mutagenese PCR 1 und 2:

Hierbei wurden zwei sich überlappende DNA-Abschnitte in zwei separaten PCRs amplifiziert. Als Matrize diente ein Plasmid, das die cDNA-Sequenz des VCP-Wildtyps enthielt.

Das Produkt der PCR 1 enthält bereits die eingeführte Mutation, da einer der Primer ein Mismatch-Primer war. Das kürzere Fragment mit 169 bp enthält keine Mutation und diente der nachfolgenden Amplifikation des mutierten cDNA-Abschnitts.

Um die funktionellen Auswirkungen der Mutation R159C auf Zellebene zu untersuchen, wurde im ersten Schritt die Mutation durch ortsgerichtete Mutagenese in ein bestehendes eukaryontisches VCP-Expressionskonstrukt eingeführt.

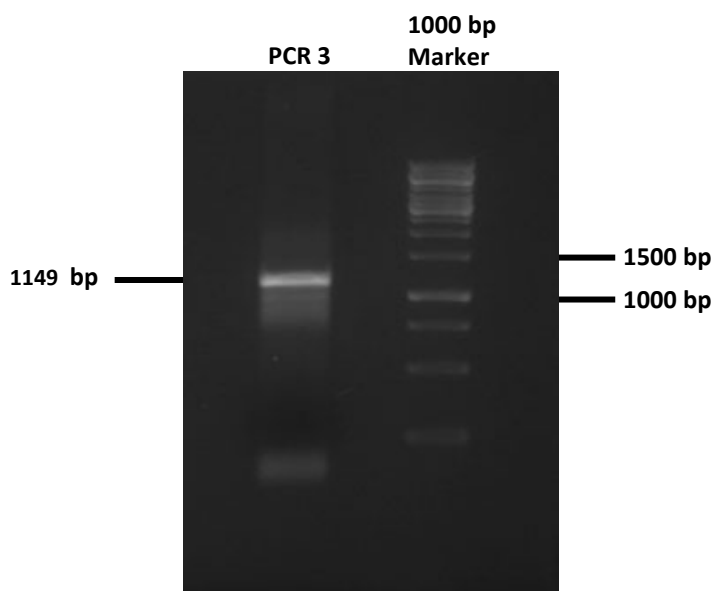


Abb. 14: Ortgerichtete Mutagenese PCR 3: Im nächsten Schritt wurden die Produkte aus der PCR 1 und 2, die so konstruiert wurden, dass sie sich um 23 bp überlappen ohne Primer für 20 Zyklen vervielfältigt bzw. aufgefüllt.

Die Mutagenesestrategie ist in Abb. 7 skizziert und in Abschnitt ausführlich 4.3.7 beschrieben. Die Agarose-Gelelektrophorese zur präparativen Aufreinigung der resultierenden PCR-Fragmente ist in Abb. 13-15 gezeigt.

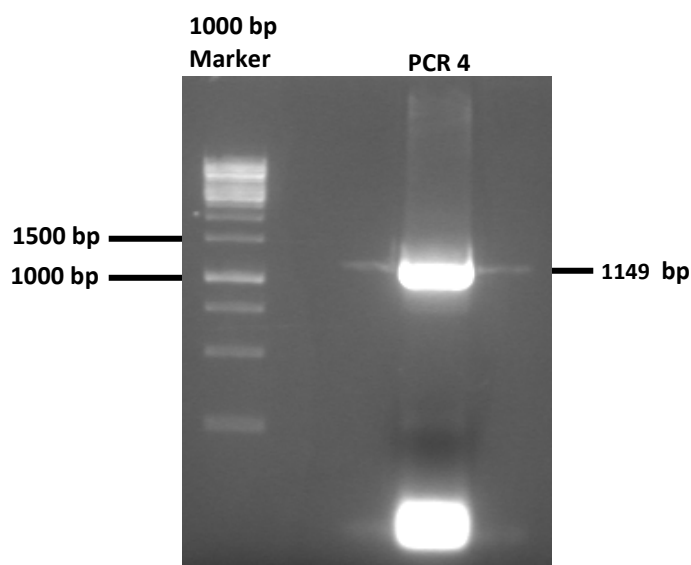


Abb. 15: Ortgerichtete Mutagenese PCR 4: Es wurde eine PCR mit dem Produkt aus der PCR 3 und den beiden äußeren Primern der ersten beiden PCRs durchgeführt. Beide Primer enthielten spezifische Restriktionsschnittstellen, die für den nachfolgenden Verdau zur anschließende Ligierungsreaktion von ausgewählten Restriktionsenzymen geschnitten werden konnten.

Das eukaryontische Expressionskonstrukt wurde mit Restriktionsverdaus überprüft. Die resultierenden Restriktionsfragmente ergeben die von der Plasmidkarte bekannten Fragmentlängen. Die neu eingeführte Punktmutation R159C wurde mit direkter Sequenzierung bestätigt.

Anschließend wurden PMI28-Zellen (Mausmyoblasten-Zelllinie) transient transfiziert. Mock-transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Alle Myoblasten wurden am Tag nach der Transfektion mittels eines Differenzierungsmediums zum Fusionieren und zur Myotubenbildung angeregt. Nach Doppelfärbung mit Antikörpern wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Olympus FV1000) zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung über 5 Tage Bilder angefertigt, um die Entwicklung der Myoblasten *in vitro* vergleichend zu beurteilen.

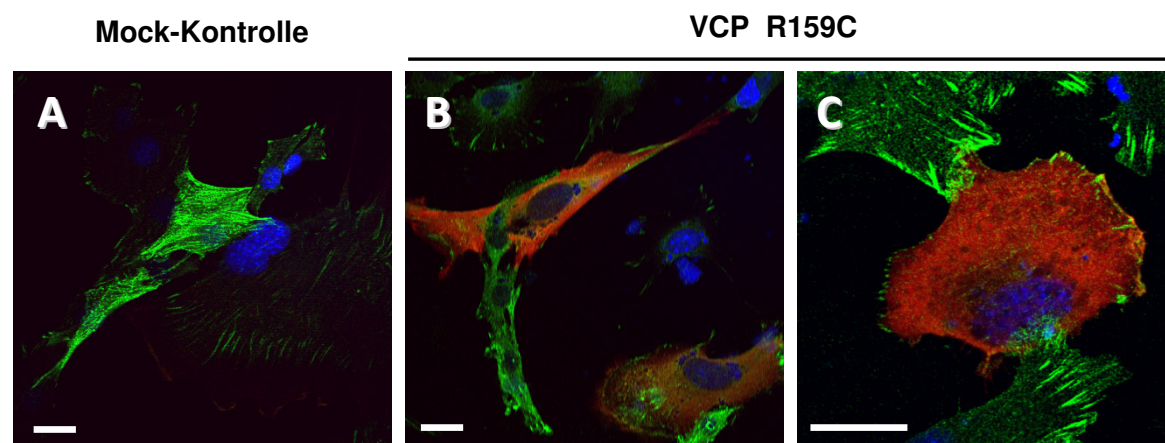


Abb. 16: Die humane VCP-Mutante R159C wurde in myogenen PMI28-Zellen als V5-Fusionsprotein transient exprimiert. Das Expressionskonstrukt wurde als Fusionsprotein mit einem C-terminalen V5-Epitop-Tag im Rahmen dieser Arbeit durch ortsgerichtete Mutagenese neu kloniert. Transiente Transfektion des Konstrukts in PMI28-Zellen, die am Tag nach der Transfektion für 8 h in Differenzierungsmedium inkubiert wurden, zeigte ein weit verteiltes V5-Signal im Zytoplasma. Zusätzlich fand sich eine geringere Expression des R159C-VCP-Konstrukts im Zellkern. Das α -Actinin-Signal war in transfizierten Zellen deutlich geringer ausgeprägt als in den benachbarten, untransfizierten Myoblasten (B und C) und im Vergleich zur Mock-Kontrolle (A). Anfärbung mit anti-V5 rabbit (Rockland, Gilbertsville, USA), Verdünnung 1:4000 und anti- α -Actinin mouse (Sigma, Saint Louis, USA), Verdünnung 1:100 und den passenden sekundären Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern Alexa Fluor® 594 anti-rabbit (rot), Verdünnung 1:500 und Alexa Fluor® 488 anti-mouse (grün), Verdünnung 1:500. Bilder: konfokales Laser-Scanning-Mikroskop FV1000 Olympus. Massstabsbalken 20 μ m.

Zellen, die mit mutierten Konstrukten transfiziert worden waren, fusionierten weniger gut und zeigten auch in ihrer Entwicklung zu Myotuben Reifungsstörungen, die anhand des Differenzierungsmarkers α -Actinin beurteilt wurden.

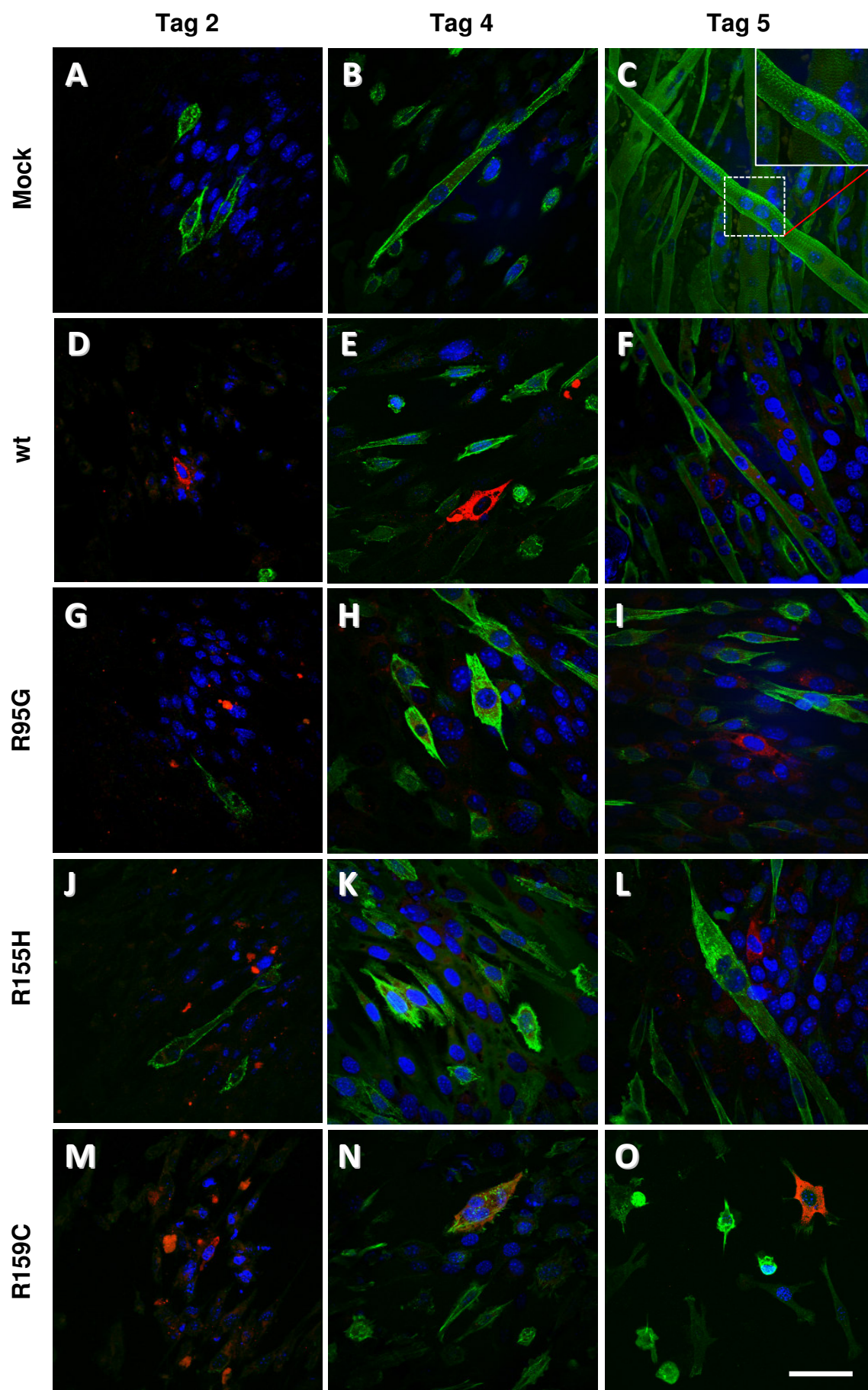
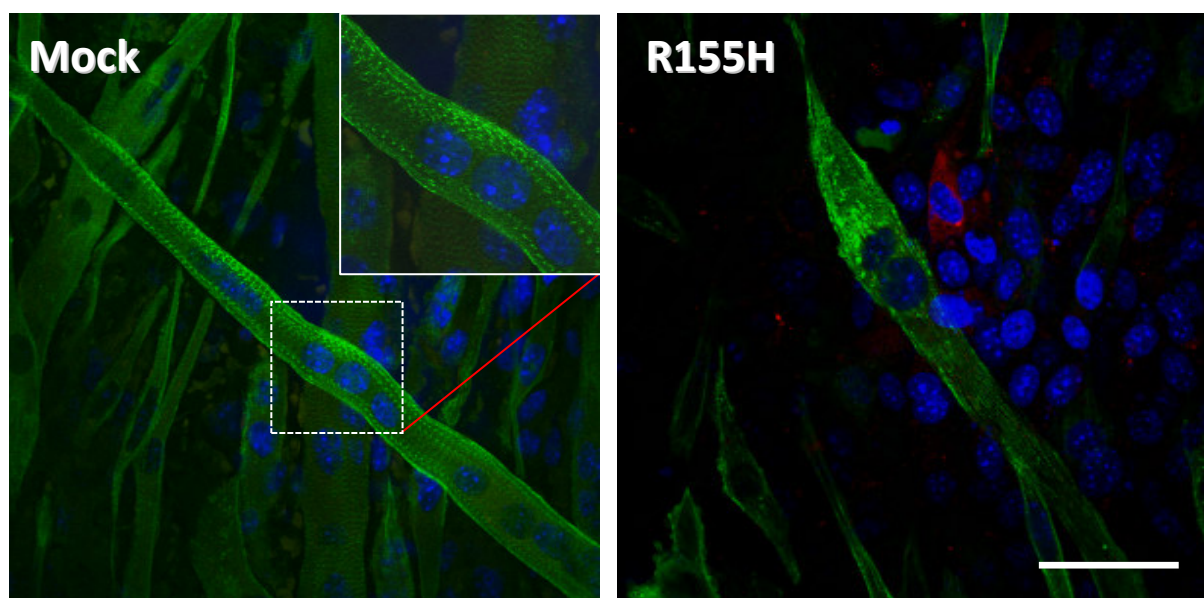


Abb. 17: Humanpathogene VCP/p97 Mutanten beeinträchtigen die Myoblastendifferenzierung *in vitro* im Zeitverlauf.

Transient mit V5-VCP-Expressionskonstrukten transfizierte PMI28-Zellen wurden 14-16 h nach Transfektion *in vitro* durch Inkubation in Fusionsmedium (DMEM, 2% Pferdeserum) differenziert und an Tag 2, 4 und 5 nach Transfektion fixiert, permeabilisiert und mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (FV1000, Olympus) analysiert. Als Differenzierungsmarker diente die Proteinexpression und subzelluläre Lokalisation des Z-Bandenproteins α -Actinin (monoklonaler Maus-Anti- α -Actinin-Antikörper, grün). Die Expression der VCP-V5-Konstrukte wurde mit Hilfe eines polyklonalen V5-Epitop-Tag-Antikörpers aus dem Kaninchen dargestellt (rot), die Zellkerne sind mit Hoechst 33258 angefärbt (blau). **A-C** Mock-Transfektion, **D-F** wt-VCP, **G-I** R95G-VCP-Mutante, **J-L** R155H VCP-Mutante, **M-O** R159C VCP-Mutante. Massstabsbalken 50 μ m.

Am ersten Tag nach Transfektion fand sich bei allen untersuchten Konstrukten eine Transfektionsrate von 15-20% der PMI28-Zellen. In der Negativkontrolle für die V5-Antikörperfärbung, der Mock-Transfektion mit Transfektionsreagens ohne Plasmidkonstrukte, wurde in PMI28-Zellen eine wesentliche, unspezifische Hintergrundfärbung durch den V5-Epitop-Tag-Antikörper ausgeschlossen (Abb. 16 A und 17 A-C). An Tag 1 nach Transfektion fand sich ein weit verteiltes V5-Signal im Zytoplasma ohne Hinweise auf Proteinaggregation der untersuchten VCP-Varianten (Abb. 16 B und C). Interessanterweise zeigten sich an Tag 2 nach Transfektion V5-positive, zytoplasmatische Proteinansammlungen bei den humanpathogenen Mutanten (Abb. 17 G, J und M). Dagegen ergab das wt-VCP-Konstrukt eine weit verteilte zytoplasmatische Färbung.

**Abb. 18: Die VCP/p97 Mutante R155H verzögert die Myoblastendifferenzierung *in vitro* im Vergleich zur Mock-Kontrolle (Tag 5)**

Vergrößerte Darstellung der Einzelbilder C und L aus Abb. 17. Die Mock-Kontrolle zeigt bereits an Tag 5 ein starkes α -Actinin-Signal mit regelmäßiger Anfärbung der Z-Banden, die ein Korrelat der Querstreifung des reifen Skelettmuskels sind. Dagegen findet sich bei den humanpathogenen VCP-Mutanten-Konstrukten, wie z. B. exemplarisch hier dargestellt bei R155H-VCP, eine nur geringgradige Fusion der Myoblasten und keine entsprechende Ausreifung der Sarkomerstrukturen in den wenigen kleinen Myotuben. Massstabsbalken 50 μ m.

Bereits nach fünf Tagen fand sich in der Mock-Kontrolle eine weitgehende Ausreifung der Myofibrillen in der überwiegenden Mehrzahl der Myotuben mit regelmäßigem Z-Bandenmuster, das ein Korrelat der bekannten Querstreifung des Skelettmuskels darstellt (Abb. 17 C und Abb. 18). Es zeigten sich an Tag 5 sogar bis zu mehrere Millimeter lange, multinukleäre Myotuben im Kontrollansatz (Abb. 16 C, Abb. 18 und Daten nicht gezeigt).

Im Transfektionsansatz mit wt-VCP wurde eine verzögerte Fusion der Myoblasten (Abb. 17 E) mit unvollständiger Ausreifung der Sarkomerstrukturen sichtbar (Abb. 17 F) im Vergleich zu den entsprechenden Zeitpunkten der Kontrolle (Abb. 17 B bzw. C).

In den Transfektionsansätzen mit den VCP-Mutanten fanden sich an Tag 5, dem längsten Beobachtungszeitraum, nur sehr spärlich kleine Myotuben, die nie mehr als drei Zellkerne enthielten. Zusätzlich waren vereinzelt einige Myoblasten mit einem intensiven V5-Signal nachweisbar, das einer deutlichen VCP-Konstrukt-Expression weit verteilt im Zytoplasma entsprach. Hinweise auf eine Proteinaggregatbildung der rekombinant exprimierten VCP-Varianten wie an Tag 2 fanden sich an Tag 4 und 5 nicht.

5.2 Analyse des Vimentin-Gens

Das Vimentin-Gen besteht aus 10 Exons, wobei das erste Exon nicht kodierend ist. Bei 27 Patienten wurden die kodierenden Exons einschließlich flankierender intronischer Bereiche mittels direkter Sequenzierung untersucht, um Hinweise auf eine eventuell noch nicht bekannte genetische Ursache einer degenerativen Myopathie im Sinne einer IBM oder degenerativen Myopathie zu entdecken. Die Auswahl der Patienten erfolgte anhand ihrer Klinik und wird in Tabelle 4 charakterisiert. Bei keinem der Patienten war bis zum Untersuchungszeitpunkt eine genetische Ursache der Muskelerkrankung in bekannten Genen identifiziert werden, weshalb sie sich zur Untersuchung des neuen Kandidatengens eigneten.

Die Patienten der ausgewählten Kohorte litten zum überwiegenden Teil unter einer im mittleren bis höheren Alter auftretenden Muskelschwäche. Die Ausprägung des Muskelbefalls war variabel. Häufig zeigte sich eine proximal und distal betonte Muskelschwäche sowie eine ausschließlich proximale Muskelschwäche. Eine deutliche CK-Erhöhung >1000 U/l konnte nur in 4 Fällen dokumentiert werden. In der Muskelbiopsie konnten bei mehr als 50% der Patienten „rimmed vacuoles“ nachgewiesen werden.

Die Exons 2-10 des Vimentin-Gens wurden mit geeigneten Primer in einer PCR amplifiziert, mittels direkter Sequenzierung analysiert und auf Mutationen untersucht. Bei keinem der 27 untersuchten Patienten konnte innerhalb der 10 kodierenden Exons und flankierender intronischer Bereiche eine krankheitsauslösende Mutation im Vimentin-Gen identifiziert werden.

Als auffälliges Ergebnis zeigten sich bei 5 der Patienten ein heterozygoter Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP). Bei einem Patienten fand sich ein homozygoter Polymorphismus an der Stelle g.1143G>C (chr10:17271400G>C) in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR). Die dazugehörige ID Nummer der SNP-Datenbank lautet rs3758410 ([Sherry et al. 2001](#)).

Bei Analyse von 47 Normalkontrollen ohne Nachweis einer neuromuskulären Erkrankung konnte bei insgesamt 5 Personen ein homozygoter, bei 16 Personen ein heterozygoter Polymorphismus an oben beschriebener Stelle nachgewiesen werden. Somit ist eher davon auszugehen, dass die genetische Variante im 5'-UTR keinen Krankheitswert bei degenerativen Erkrankungen des Muskels besitzt.

Charakterisierung der Patientenkohorte (n=27)		
Geschlecht	weiblich:	9
	männlich:	16
Ausbruch der Krankheit, Alter	<35	5
	>35	20
Maximaler CK-Wert im Verlauf, in U/l	<180	3
	180-1000	18
	>1000	4
Muskelbiopsie	"rimmed vacuoles"	15
	"rimmed vacuoles" in EM	4
	unauffällig	1
	keine Biopsie	3
	EM-filaments und	
	autophag. Vakuolen	1
	diff. Polymyositis	3
	Einschlusskörpermyositis	1
Muskelschwäche	EM filaments	1
	proximal	7
	distal	4
	proximal und distal	11
	Gliedergürteltyp	1
	vorwiegend obere Extremität	1
	vorwiegend untere Extremität	3
	keine	1
Pathologisch definierte IBM modifiziert nach (Griggs et al. 1995)		4
Klinisch definierte sporadische IBM		10
Mögliche sporadische IBM		4
Inflammation ohne "rimmed vacuoles" (Polymyositis)		3
Sonstiges	Kardiomyopathie	1
	Hypästhesie und Hypalgesie	1
	Rollstuhlpflichtig	1
	Ptose	1
	Polyneuropathie	1

Tabelle 4 : Charakterisierung der Patientenkohorte (n=27), die auf Mutationen im Vimentin-Gen untersucht wurden.

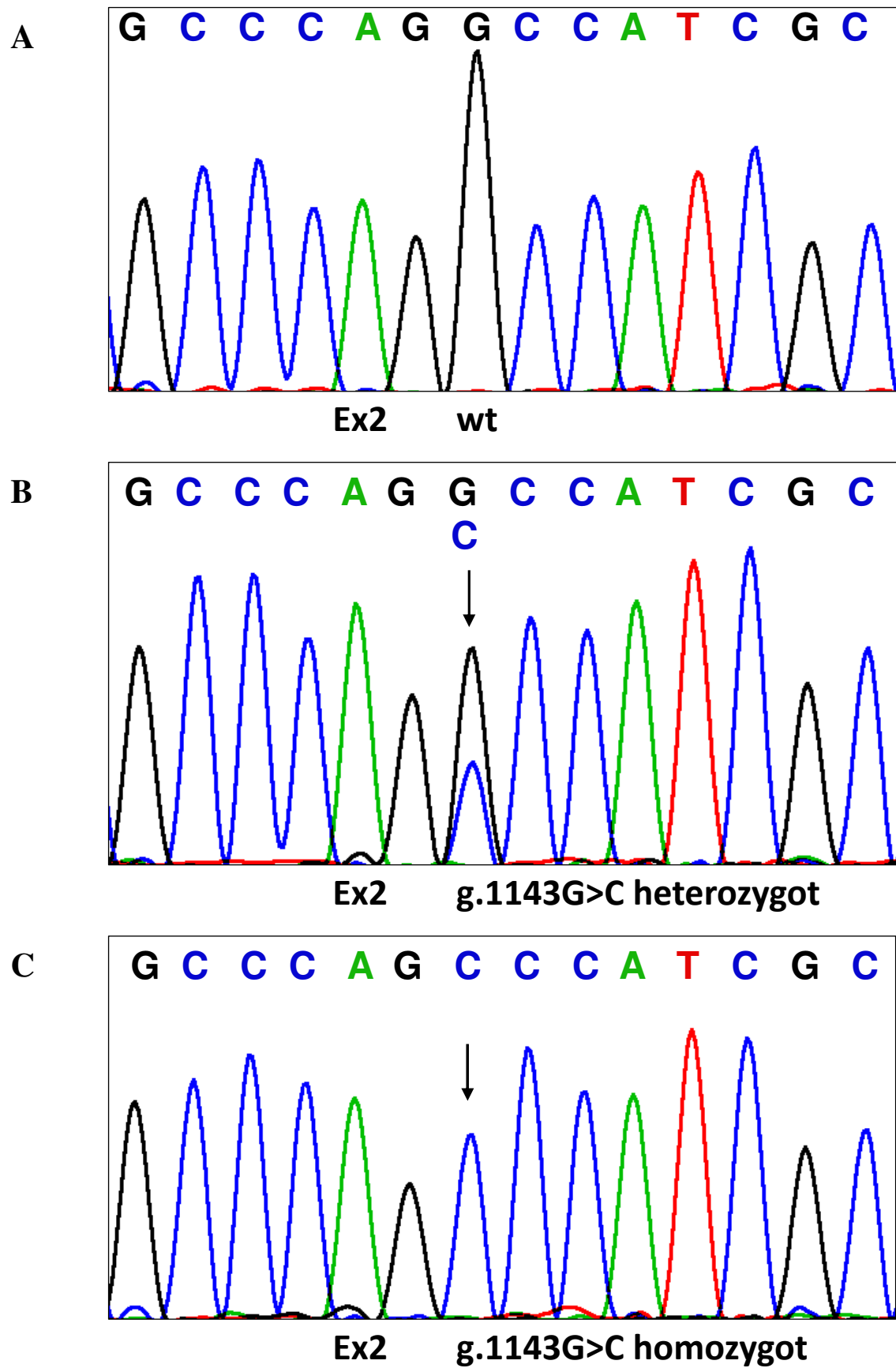


Abb. 19: Elektropherogramme von A: dem Wildtyps der betreffenden Sequenz g.1143 im Exon 2., **von B:** dem heterozygoten Polymorphismus g.1143G>C und **von C:** dem homozygoten Polymorphismus g.1143G>C.

5.3 Analyse des Myotilin-Gens

5.3.1 Klinische Charakterisierung

Bei der Patientin handelte es sich um eine zum Untersuchungszeitpunkt 54-jährige türkischstämmige Frau. Sie stellte sich initial mit langsam fortschreitender proximaler Muskelschwäche der unteren Extremität vor. Das Auftreten der Erkrankung wurde mit etwa 40 Jahren von der Patientin bemerkt, als ihr das Treppensteigen Beschwerden machte. Einige Jahre später folgte die Beteiligung der proximalen oberen Extremität. Im weiteren Verlauf dehnte sich der Befall auch auf die distalen Muskelpartien aus. Dies machte sich besonders an den Fingerbeugern und den Fußstreckern bemerkbar.

Im Alter von 50 Jahren war die Patientin auf einen Rollstuhl angewiesen.

Mit 52 Jahren begann eine zunehmend progrediente Ateminsuffizienz, die mit einer nicht-invasiven Beatmung behandelt wurde. Drei Jahre darauf verstarb die Patientin an einem Multiorganversagen im Rahmen einer Sepsis als Folge einer Aspirationspneumonie.

Die Mutter der Patientin litt ebenfalls unter einer Muskelschwäche. Gangstörungen wurden bei ihr im Alter von 68 Jahren symptomatisch. Sechs Jahre später wurde sie rollstuhlpflichtig bis zu ihrem Tod im Alter von 79 Jahren.

Von den Geschwistern der Patientin (zwei Schwestern und ein Bruder, der im Alter von 35 Jahren tödlich verunglückte) hatte eine Schwester ebenfalls Gangstörungen. Sie lehnte jedoch jegliche weitere Diagnostik ab. Die anderen beiden Geschwister sowie die drei Kinder der Patientin hatten keinerlei muskuläre Symptome. Aus den vorliegenden Informationen ist ein autosomal-dominanter Erbgang am wahrscheinlichsten.

Bei der körperlichen Untersuchung boten sich folgende Auffälligkeiten: Die Kraftgrade der proximalen oberen Extremität waren deutlich eingeschränkt. Die Arm-Abduktion fand sich bei 1/5, die Ellbogen-Strecker bei 2/5, während die distale Muskulatur mit 3-4/5 nur mild eingeschränkt war. An der unteren Extremität zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Hüftbeuger und -strecker sowie die Kniebeuger und -strecker waren stark beeinträchtigt (1/5), die distale Fußmuskulatur war dagegen nur geringfügig in der Muskelkraft eingeschränkt. Das Stehen und Gehen war der Patientin nicht möglich. Die mimische Muskulatur war leichtgradig betroffen, zudem berichtete die Patientin über eine Dysphagie.

Symptome einer nasalen Sprache, einer Dysarthrie, von Kontrakturen, einer Polyneuropathie oder sensorischer Störungen konnten bei der Patientin nicht beobachtet werden. Bei der kardialen Diagnostik mittels EKG, Langzeit-EKG, transthorakaler Echokardiographie und Herz-MRT wurden keine Auffälligkeiten festgestellt.

Eine deutliche Einschränkung der respiratorischen Situation konnte mittels Lungenfunktionsprüfung und Blutgasanalysen quantifiziert werden. Der pO_2 lag bei 74 mm Hg, der pCO_2 bei 42 mm Hg, was einer respiratorischen Globalinsuffizienz entsprach. Die Vitalkapazität war auf 45% des Normwertes vermindert.

In der MRT-Untersuchung in der T1w-Bildgebung war eine symmetrische, komplette fettige Degeneration vieler Muskeln sichtbar (Schultergürtelmuskulatur, Oberarme, M. trapezius, M. sternocleidomastoideus, Thorax- und abdominale Muskulatur). Eine annähernd vollständige fettige Umwandlung der Muskulatur konnte noch in vielen weiteren Muskeln nachgewiesen werden. (u. a. M. psoas, Glutealmuskulatur, Hüftmuskeln, M. quadriceps, M. gracilis, M. sartorius). Lediglich der M. tibialis anterior war nur leichtgradig betroffen.

In der Elektromyographie (EMG) wurden deutliche myopathische Veränderungen mit verminderten Amplituden gesehen. Es zeigte sich kein Hinweis auf eine periphere Neuropathie. Laborchemisch war die Kreatinkinase (CK) auf 250-300 U/l (Normwert <155 U/l) erhöht.

5.3.2 Histopathologische Analyse

Im Rahmen mehrerer Aufenthalte wurden insgesamt vier Muskelbiopsien entnommen. Die erste Biopsie erfolgte im Alter von 40 Jahren nach Beginn der ersten Symptome. Dabei konnte eine Polymyositis initial nicht ausgeschlossen werden. Histopathologische Befunde waren eine leichte Fibrose, Faserkalibervariationen und milde myopathische Veränderungen. Immunhistologisch wurden entzündliche Veränderungen sichtbar. In einigen Fasern wurden autophagische, runde Vakuolen nachgewiesen.

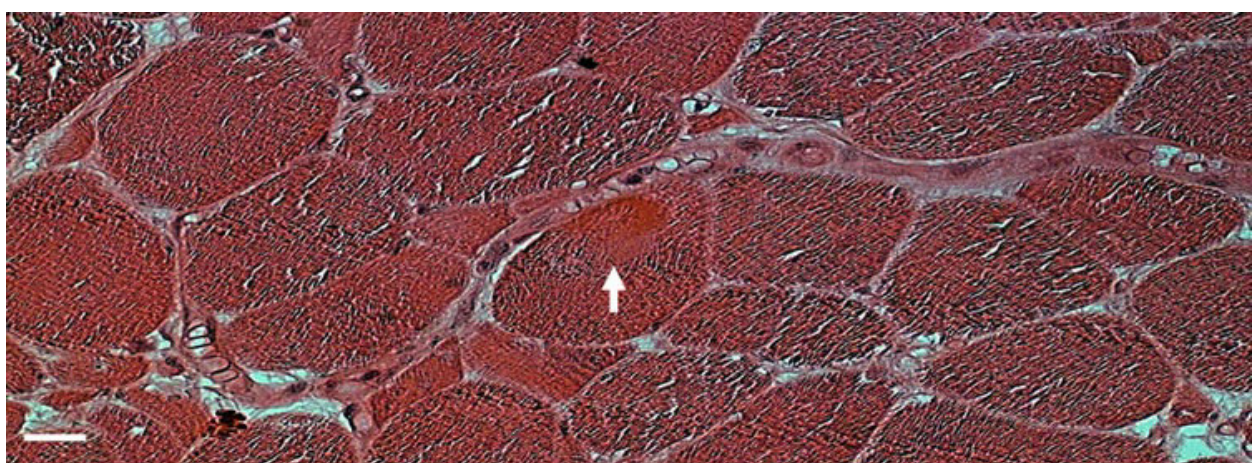


Abb. 20: Muskelbiopsie im Alter von 53 Jahren, HE Färbung mit einigen wenigen subsarkolemmal gelegenen Aggregaten (Pfeil) und myopathischen Veränderungen. Massstabsbalken: 10µm. Aus [\(Reilich et al. 2011\)](#).

Es folgten daraufhin über Jahre immunsuppressive Therapien [Prednisolonmonotherapie oder in Kombination mit Methotrexat, Azathioprin oder i. v. Immunglobuline (IVIG)] ohne wesentliche Beeinflussung der Krankheitsprogression.

Im Alter von 50 Jahren wurden zwei weitere Gewebeproben (initial unter immunsuppressiver Therapie, anschließend ohne Therapie) untersucht. Diagnostisch gab es damals noch immer keinen Hinweis auf eine Myofibrilläre Myopathie oder Proteineinschlüsse in den Muskelzellen. In der letzten Biopsie, drei Jahre später, wurde Gewebe des linken M. tibialis anterior entnommen. Es fanden sich mittelgradig bis schwere myopathische Veränderungen, einige runde autophagische Vakuolen, endomysiale Fibrose und Faserkaliberschwankungen. In der HE-Färbung konnte in einigen Fasern Proteinaggregate sichtbar gemacht werden.

Immunfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen Myotilin, alpha-B-Crystallin und Desmin zeigten keine Proteinansammlungen.

5.3.3 Molekulargenetische Analyse

Die genetische Analyse des Myotilin-Gens wurde mittels direkter Sequenzierung der Exons 1-10 durchgeführt. Zum Ausschluss anderer genetischer Ursachen wurden auch noch die Gene *DES*, *FKRP* (Exon 4) sowie *VCP* sequenziert und auf Mutationen untersucht. Zur möglichst zuverlässigen Vorhersage über die klinische Pathogenität einer gefundenen Mutation wurden Vorhersage-Algorithmen wie PolyPhen-2, MutationTaster und SIFT (InSilico Functional Profiling) verwendet.

Bei der Patientin konnten zuvor Mutationen im *DES*-, *FKRP*- und *VCP*-Gen ausgeschlossen werden. Bei der Sequenzierung des *MYOT*-Gens wurde eine bisher nicht beschriebene Mutation identifiziert. Es handelte sich hierbei um einen heterozygoten Aminosäureaustausch in Exon 2 (n.17G>A), welcher zu einer Missense-Mutation in p.Arg6His führte. In 70 türkischen Kontrollchromosomen und 140 europäischen Kontrollchromosomen war die Mutation nicht nachzuweisen. Laut Vorhersage-Algorithmen verursacht der Basenaustausch einen Funktionsverlust des Myotilin-Proteins. Es ist ein phylogenetisch hoch-konservierter Anteil des Proteins betroffen.

Der beschriebene Fall ist eine spät-auftretende, schwerwiegend verlaufende Form der LGMD1A. Aufgrund der bekannten klinischen Angaben ist der Erbgang autosomal-dominant, da sowohl die Schwester als auch die Mutter der Patientin betroffen sind.

6 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein genaues Augenmerk auf das heterogene Bild der hereditären Einschlusskörpermyopathien gelegt. Es wurden die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen untersucht und detaillierte klinische und funktionelle Analysen von neuen Mutationen und eines Kandidatengens durchgeführt.

6.1 Mutationen im *VCP*-Gen

In der Literatur wurden bereits über 20 unterschiedliche Mutationen im *VCP*-Gen beschrieben. Es handelt sich häufig um Mutationen an ähnlichen Stellen, sogenannten „hot spots“.

Auch bei der in dieser Arbeit analysierten Mutation R159C handelt es sich um eine Mutation in einem bekannten Mutations-Hotspot. Sie wurde bisher einmal in der Literatur beschrieben, häufiger findet sich die Mutation R159H sowie Mutationen an der Stelle 155, die sich nur vier Aminosäurepositionen entfernt befindet ([Haubenberger, et al. 2005](#), [van der Zee et al. 2009](#)).

Interessant ist die klinische Heterogenität, die sich bei der genaueren Analyse der Genotyp-Phänotyp-Korrelation präsentiert. Im unmittelbaren Vergleich verschiedener Patienten mit der identischen Mutation R159C haben manche Patienten ausschließlich eine IBM und eine FTD ([Bersano, et al. 2009](#)), während sich der in dieser Arbeit detailliert untersuchte Patient mit einer IBM und einem Morbus Paget vorstellte. Bei einem weiteren Patienten, bei dem eine R159C-Mutation identifiziert wurde, konnten isolierte Symptome einer IBM ohne Hinweise auf einen PDB oder eine FTD beschrieben werden.

Ähnliches wurde auch bei der Mutation R159H beobachtet. Es gab milde Verläufe mit Symptomen einer IBM und einem PDB ([Haubenberger, et al. 2005](#)), dazu im Gegensatz auch Phänotypen ohne eine Muskelbeteiligung mit einer FTDL mit oder ohne PDB ([van der Zee, et al. 2009](#)). Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Patienten mit einer p.Arg155Cys Mutation im *VCP*-Gen trat die IBM früher auf als bei Individuen mit anderen Mutationen. Patienten mit einer p.Arg155His Mutation zeigten einen späteren Krankheitsbeginn der PDB im Vergleich zu anderen Patienten ([Watts, et al. 2007](#)). In einer einzelnen Familie wurde ein besonders aggressiver Verlauf der Erkrankung beobachtet. Diese hatten eine Mutation in der hauptkatalytischen D1-ATPase-Domäne von *VCP* (p.Ala232Glu), welche für die Hexamerstruktur bedeutend ist.

Es stellt sich die Frage, weshalb sogar innerhalb einer Familie die gleiche Mutation bei verschiedenen Familienmitgliedern zu unterschiedlicher Krankheitsausprägung führen kann. Einerseits sind Umweltfaktoren zu diskutieren, die zu unterschiedlichen Phänotypen führen

können. Andererseits zeigt sich mit zunehmender Verbesserung der molekulargenetischen Analysetechniken, dass ein modifizierender genetischer Hintergrund im Sinne sogenannter „Modifier Gene“ in einem Individuum zu relevanten Änderungen des Phänotyps einer monogenen Erkrankung führen kann. Bei verschiedenen neuromuskulären Erkrankungen haben sich interessanterweise wiederholt modifizierende Genvarianten von Faktoren gezeigt, die im TGF β -Signalweg eine bedeutende Rolle spielen ([Lamar KM und McNally EM, 2014](#)).

Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass es bei einem so kleinen Patientenkollektiv und gerade bei der speziellen Symptom-Trias sehr schwierig ist, zuverlässige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu prognostizieren.

Für die klinische Erstdiagnostik hat dies zur Folge, dass eine molekulargenetische Analyse auch beim isolierten Auftreten einer oder zwei der spezifischen Symptome der IBMPFD durchgeführt werden sollte, wenn insbesondere auch im Hinblick auf die Familienanamnese der begründete Verdacht auf eine IBMPFD besteht. Eine molekulargenetische Analyse bei Patienten ist auch dann gerechtfertigt, wenn die Patienten keine Blutsverwandten mit Muskelerkrankungen haben. Die Erfahrungen zeigen, dass ca. 1/3 vieler genetisch bedingter Myopathien sporadisch auftreten. Auch die untersuchten Patienten hatten in ihrer Familie keine anamnestisch eruierbare genetische Vorbelastung.

Für die weitere Forschung bedeutet es, dass es wichtig ist, möglichst umfassende Informationen über die Erkrankung und ihre molekulargenetischen Hintergründe zu sammeln, um eine optimale Diagnostik zu gewährleisten. Die therapeutische Versorgung umfasst derzeit eine regelmäßige, stabilisierende Physiotherapie und Hilfsmittelberatung und soll künftig in neuen therapeutischen Strategien im Sinne einer personalisierten Medizin münden.

Im experimentellen Forschungsgebiet etablierten mehrere Forschungsgruppen transgene Mausmodelle mit der R155H-Mutation. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zeigten die Tiere im Alter von 6 Monaten eine progrediente Muskelschwäche. Die histologische Analyse zeigte Vakuolen in den Myofibrillen und zentrale Muskelkerne. Immunhistochemisch färbten sich TDP-43-Ansammlungen und Ubiquitin-positive Einschlusskörperchen sowohl im Muskel (M. quadriceps) als auch im Gehirn an. Auch die Knochenbeteiligung konnte mittels Röntgen-Mikrotomographie und Histologie nachgewiesen werden. Sichtbar wurden eine verminderte Dicke der Kortikalis und eine Verminderung der Trabekelstruktur. Folglich präsentierten die mutierten Mäuse den kompletten Phänotyp einer IBMPFD und stellen demnach ein sinnvolles Modell für präklinische Studien dar ([Badadani et al. 2010](#)).

6.1.1 Die Mutation an Position R159C

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei zwei Patienten eine VCP-Mutation an der Stelle R159C identifiziert. Wie oben genau ausgeführt zeigte der **Patient A** klinisch die Symptome einer Myopathie und eines M. Pagets, eine frontotemporale Demenz konnte zum Untersuchungszeitpunkt nicht festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt war der Patient 61 Jahre alt. Das mittlere Manifestationsalter einer Demenz bei einer IBMPFD liegt um das 54. Lebensjahr. Die ersten Symptome der Muskelschwäche traten im Alter von 56 Jahren auf. Bei den meisten Patienten mit IBMPFD können die ersten Symptome bereits zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auftreten und klinisch apparent werden. Der genaue Beginn des Knochenbefalls war nicht eruierbar. Man kann daraus schließen, dass es sich eher um einen milden Verlauf bei der vorliegenden Mutation an der Stelle R159C handelt, da der Symptombeginn eher spät war. Der weitere Verlauf ist nicht beurteilbar, da der Patient keine Nachsorgekontrollen in Anspruch genommen hat.

Der **Patient B** konnte im Verlauf mit einer IBMPFD und derselben Mutation im Rahmen der klinischen Diagnostik identifiziert werden. Bei diesem Patienten begannen die ersten muskulären Symptome im Alter von 59 Jahren, auch 10 Jahre später konnte noch keine frontotemporale Demenz oder ein Knochenbefall beobachtet werden. Der Patient ist trotz stetiger Progredienz der Erkrankung sportlich aktiv (Radfahren, Joggen) und zeigt auch abseits des Muskelbefalls keinen Hinweis auf eine Ausbildung neurologischer Symptome oder eines M. Pagets. Auch hier lässt die Klinik auf einen eher milden Befall mit langsamer Progredienz schließen.

Im Vergleich der beiden identischen Mutationen zeigt sich erneut die klinische Heterogenität der Erkrankung, da selbst bei den identischen Mutationen kein homogener Phänotyp zu erkennen ist (vergleiche Tab. 2).

Die Laborparameter bei beiden Patienten mit einer milden CK-Erhöhung sowie der fettigen Degeneration der betroffenen Muskeln in der MRT-Bildgebung sind kongruent mit Vergleichswerten aus der Literatur. Auch der Muskelbefall der Patienten mit einer überwiegend proximal betonten Muskelschwäche ist typisch für eine IBM bei einer IBMPFD. Somit handelt es sich insbesondere beim Muskelbefall um einen klassischen klinischen Verlauf der Erkrankung.

6.1.1.1 Funktionelle Untersuchung der Mutation R159C

Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Arbeiten, die sich mit der Mutation R159C beschäftigen haben ([Bersano, et al. 2009](#)). Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, den Einfluss dieser Mutation im VCP-Gen in der Zellkultur genauer untersuchen. Hierbei ging es primär darum, zu zeigen, ob die Mutation einen negativen Einfluss auf die Myofibrillen- bzw. Myotubenbildung ausübt und

ob während der Zelldifferenzierung *in vitro* eine sichtbare Veränderung der sich entwickelnden Sarkomerstruktur erfolgt.

Im Zellkulturmodell wurde vergleichend untersucht, ob weitere humanpathogene VCP-Mutanten *in vitro* die Differenzierung myogener Zellen und insbesondere die Syncytium-Bildung mittels Myoblastenfusion bis zu terminal differenzierten multinukleären Myotuben beeinträchtigen können.

Interessanterweise zeigten sich an Tag 2 nach Transfektion zytoplasmatische Proteinansammlungen bei den humanpathogenen Mutanten, die möglicherweise Proteinaggregaten entsprechen. Eine Aggregationsneigung der pathogenen Mutanten auch *in vivo* kann nicht ausgeschlossen werden und könnte Teil des Pathomechanismus bei der IBMPFD sein. Es ist allerdings kritisch zu bedenken, dass in dem *in vitro*-Zellkulturmodell unter dem CMV-Promoter des eukaryontischen Expressionskonstrukts eine Überexpression der VCP-Konstrukte vorlag, die nicht der zellulären Expressionskontrolle unterlag. Bemerkenswert ist dennoch, dass das überexprimierte Wildtyp-VCP-Konstrukt eine weitgehend normale, zytoplasmatische Verteilung aufwies, was die Hypothese einer Aggregationsneigung der humanpathogenen VCP-Mutanten unterstützt. Eine Aggregationsneigung mutierter Proteine kann u. a. durch eine Konformationsänderung erklärt werden oder durch eine fehlerhafte Erkennung und Bindung von Kofaktoren. Es ist interessant, dass die Punktmutationen im VCP-Gen bei der IBMPFD überzufällig häufig Arginin-Reste betreffen, die von wesentlicher Bedeutung für die intermolekulare Proteinassoziation sein können ([Jones 2012](#)).

Die wenigen kurzen Myotuben mit 2-3 Zellkernen die sich in den mit Mutanten transfizierten Ansätzen finden, zeigten kein prominentes V5-Signal. Es ist zu diskutieren, ob dies einem Verdünnungseffekt innerhalb der großen Myotuben nach Fusion mit transfizierten Zellen entspricht oder ob die episomal vorliegenden Plasmidkonstrukte im Zeitverlauf innerhalb des Beobachtungszeitraums von fünf Tagen abgebaut werden. Eine alternative Erklärung wäre, dass nur Myoblasten fusionskompetent sind, die kein Plasmidkonstrukt aufgenommen haben. Hierfür spricht die Beobachtung, dass an Tag 1 nach Transfektion nur eine relativ geringe Expression des Differenzierungsmarkers α -Actinin in den transfizierten Myoblasten mit positivem V5-Epitop-Tag-Signal vorliegt im Gegensatz zu benachbarten, untransfizierten Zellen.

Im Hinblick auf die gute Transfektionsrate, die sich an Tag 1 fand und die auffällige Reduktion des V5-Signals im weiteren Verlauf, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um zu klären, ob zwischen Tag 2 und 4 nach Transfektion transfizierte Zellen durch toxische Effekte der VCP-Konstrukte z. B. durch Apoptose untergingen.

Gegenwärtig bleibt auch offen, ob die beobachtete Verzögerung und Störung der Myoblastendifferenzierung durch humanpathogene VCP-Mutanten zusätzlich durch interzelluläre Signaltransduktion vermittelt werden kann, über die bislang keine Daten vorliegen. An Tag 4 enthielten ähnlich viele Myoblasten ein positives α -Actinin-Signal wie bei dem wt-VCP-Konstrukt. Daher erscheint eine Expressionsstörung von α -Actinin als myogenem Differenzierungsmarker unwahrscheinlich. Allerdings war an Tag 5 die Fusionskapazität in den Mutantenansätzen deutlich verringert im Vergleich zum wt-VCP-Ansatz, der quantitativ mehr und qualitativ längere Myotuben mit deutlich mehr als drei Zellkernen aufwies. In diesem Zusammenhang ist eine mögliche parakrine oder exokrine Signalwirkung der wenigen noch verbliebenen transfizierten Einzelzellen im Fusionsansatz zu diskutieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre eine Metabolom- oder Proteomanalyse des Zellkulturüberstands weiterführend. Insgesamt bestätigten die *in vitro*-Fusionsexperimente mit transfizierten, murinen myogenen Zellen auch die zuvor in humanen Myoblasten *in vitro* beobachtete Entwicklungsstörung durch eine VCP/p97-assoziierte Fehlregulation des Myosinfilamentaufbaus mit fehlender Reifung der regelhaften Sarkomerstruktur ([Janiesch, et al. 2007](#)). Darüber hinaus zeigte sich im Zellkulturmodell eine Vielzahl von Ansätzen für zusätzliche, potentielle Pathomechanismen, die durch Mutanten des multifunktionalen VCP/p97 verursacht sein könnten und möglicherweise auch für die Pathogenese des IBMPFD-Syndroms relevant sind.

6.2 Mutationen im Myotilin-Gen

Im Myotilin-Gen wurde eine bisher noch nicht beschriebene Mutation p.Arg6His (n.17G>A) im Exon 2 erstmals identifiziert. Sie ist mit großer Wahrscheinlichkeit Ursache einer spätbeginnenden, schwerwiegend verlaufenden Gliedergürteldystrophie Typ LGMD1A.

Es handelt sich bei der Mutationsstelle um ein phylogenetisch hoch konserviertes Areal. In Vorhersagealgorithmen wie Polyphen-2 und MutationTaster ergab sich eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation die Funktion des Proteins stört und somit ursächlich für eine Erkrankung ist (Polyphen-2: Wahrscheinlichkeit von 0,999 bei einer Sensitivität von 0,11 und einer Spezifität von 0,99 und MutationTaster-Vorhersage mit 0,91). Des Weiteren fand sich in 210 türkischen und europäischen Kontrollchromosomen keine Mutation an der beschriebenen Stelle. Es handelt sich um ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster, da die Mutter und die Schwester der türkischstämmigen Patientin ebenfalls von den Symptomen betroffen waren, allerdings in geringerer Ausprägung und mit einem späteren Krankheitsbeginn.

Mutationen im Myotilin-Gen verursachen auch die *MYOT*-assoziierten Myofibrillären Myopathien (Myotilinopathien). Der Muskelbefall bei dieser Untergruppe der Myopathien

beschränkt sich nicht allein auf die Gliedergürtelmuskeln, sondern es sind fast immer auch die distalen Muskeln, speziell der M. tibialis anterior und posterior und die Peroneusmuskeln betroffen. Neben den muskulären Symptomen ist die Myotilinopathie häufig auch mit einer peripheren Polyneuropathie vergesellschaftet.

Bei der beschriebenen Patientin fand sich im Gegensatz dazu keine Beteiligung der peripheren Nerven und das muskuläre Befallsmuster unterschied sich zum typischen Muster bei den Myotilinopathien: der schwerste Muskelbefall befand sich in den Gliedergürtelmuskeln. Sowohl die klinischen, als auch die histopathologischen Merkmale bei der Patientin sprechen also eher für eine LGMD1A. Verglichen mit bisher beschriebenen Verläufen handelt es sich um einen rasch progredienten Verlauf mit einer zusätzlichen Ateminsuffizienz und Dysphagie als neuen, bisher noch nicht beschriebenen Zusatzsymptomen bei einer *MYOT*-assoziierten LGMD1A. Die Patientin war nach einem Krankheitsverlauf von 10 Jahren auf den Rollstuhl angewiesen, während andere Myotilinopathie-Patienten häufig bis zu 20 Jahre nach Krankheitsbeginn gehfähig bleiben.

6.3 Analyse des Kandidaten-Gens Vimentin

Das Vimentin-Gen wurde bei einer Patientenkohorte von 27 Patienten direkt sequenziert und auf mögliche pathogene Mutationen untersucht. Bei keinem dieser Patienten konnte eine genetische Ursache der Muskelerkrankung identifiziert werden, weswegen sich die Kohorte zur Untersuchung eines neuen Kandidatengens eignete. Das Vimentin-Gen besteht aus 10 Exons, wobei das erste Exon nicht kodierend ist. Es handelt sich um ein Intermediärfilament wie Desmin, welches bekannterweise bei neuromuskulären Erkrankungen mutiert sein kann. Vimentin akkumuliert außerdem bei Myofibrillären Myopathien in Aggregaten. Diese Tatsachen rechtfertigen die Hypothese, dass auch das Vimentin-Gen selbst bei muskulären Erkrankungen mutiert sein könnte ([Ferrer and Olive 2008](#)).

Im untersuchten Patientenkollektiv konnten kein Basenaustausch in der kodierenden Sequenz festgestellt werden. Bei einem Patienten zeigte sich ein intronischer homozygoter Polymorphismus, bei 5 Patienten ein heterozygoter Polymorphismus, der im Ergebnisteil genauer beschrieben wurde. Diese Veränderungen wurden jedoch auch bei der gesunden Kontrollgruppe (n=47) identifiziert. Hierbei waren es 5 homozygote Polymorphismen und 16 heterozygote Polymorphismen. Daraus lässt sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit schließen, dass diese Polymorphismen keine Erklärung für eine Erkrankung des Muskelapparates bieten. Möglicherweise ist das Patientenkollektiv von n=27 zu klein, um bei so seltenen Erkrankungen ein neues Kandidatengen zu prüfen.

In der Literatur wurden Mutationen im Vimentin-Gen bisher nur im Zusammenhang mit einer dominanten Kataraktform beschrieben ([Muller, et al. 2009](#)). Bei anderen erblichen Muskelerkrankungen wie z. B. der myotonen Dystrophie 1 (DM1) und 2 (DM2/PROMM) gibt es aber auch einen Zusammenhang mit einer Augenbeteiligung im Sinne von Kataraktbildung vor dem 60. Lebensjahr ([Romeo 2012](#)). Dies ist ein weiterer Hinweis, warum die Untersuchung des Vimentin-Gens im Zusammenhang mit noch ungeklärten Ursachen einer Myopathie durchaus gerechtfertigt ist. Leider konnte in dieser Arbeit keine krankheitsauslösende Veränderung im Vimentin-Gen nachgewiesen werden, jedoch könnte die Idee für weitere Forschungsarbeiten in größerem Rahmen bei doch sehr seltenen Erkrankungen interessant sein.

6.4 Bedeutung der genetischen Diagnostik und Ausblick

Die genetische Diagnostik wird in den Kliniken abseits der medizinischen Forschung derzeit nur in begründeten Fällen gegen Ende des diagnostischen Prozederes eingesetzt. Dies ist durchaus als sinnvoll zu bewerten, da die klinischen und apparativen Untersuchungen die Wahl der zu untersuchenden Gene auf ein sinnvolles Maß einschränkt. Dann jedoch ist eine genetische Diagnostik eine wertvolle Zusatzinformation, da sie bei der Klassifikation der Erkrankung hilfreich ist, Aussagen über die Prognose vereinfacht und auch weiterführende Diagnostik (bei IBMPFD Demenztestung und AP-Bestimmung/MRT/Skelettuntersuchungen) begründet. Zusätzlich hat eine genetische Erkrankung auch Auswirkungen auf die Familienplanung, sodass der sorgfältigen Diagnosestellung eine professionelle humangenetische Beratung folgen kann und sollte.

Die Therapie der in dieser Arbeit behandelten Erkrankungen beschränkt sich derzeit überwiegend auf supportive Maßnahmen. In Zukunft werden aber vielleicht spezifische Gentherapien angeboten werden können, die eine genetische Diagnostik als Basis dringend benötigen. Dies erklärt die Notwendigkeit intensiver Forschungsbemühungen im Bereich der neuromuskulären und bisher unheilbaren, degenerativen neurologischen Erkrankungen, um die zugrunde liegenden komplexen molekularen Pathomechanismen besser zu verstehen und künftig kausale Therapiestrategien zu entwickeln.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Alexandru G, Graumann J, Smith GT, Kolawa NJ, Fang R, Deshaies RJ. 2008. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. *Cell*. Sep 5;134:804-816.

Amm I, Sommer T, Wolf DH. 2013. Protein quality control and elimination of protein waste: The role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et biophysica acta*. Jul 10.

Appel SH, Zhao W, Beers DR, Henkel JS. 2011. The microglial-motoneuron dialogue in ALS. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases*. Jun;30:4-8.

Argov Z, Yarom R. 1984. "Rimmed vacuole myopathy" sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. *Journal of the neurological sciences*. Apr;64:33-43.

Askanas V, Engel WK. 2003. Proposed pathogenetic cascade of inclusion-body myositis: importance of amyloid-beta, misfolded proteins, predisposing genes, and aging. *Current opinion in rheumatology*. Nov;15:737-744.

Askanas V, Engel WK. 2006. Inclusion-body myositis: a myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology*. Jan 24;66:S39-48.

Ayala YM, Pantano S, D'Ambrogio A, Buratti E, Brindisi A, Marchetti C, Romano M, Baralle FE. 2005. Human, Drosophila, and C.elegans TDP43: nucleic acid binding properties and splicing regulatory function. *Journal of molecular biology*. May 6;348:575-588.

Badadani M, Nalbandian A, Watts GD, Vesa J, Kitazawa M, Su H, Tanaja J, Dec E, Wallace DC, Mukherjee J, et al. 2010. VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease. *PloS one*.5. Epub 2010/10/20.

Bar H, Fischer D, Goudeau B, Kley RA, Clemen CS, Vicart P, Herrmann H, Vorgerd M, Schroder R. 2005. Pathogenic effects of a novel heterozygous R350P desmin mutation on the assembly of desmin intermediate filaments in vivo and in vitro. *Human molecular genetics*. May 15;14:1251-1260.

Bersano A, Del Bo R, Lamperti C, Ghezzi S, Fagiolari G, Fortunato F, Ballabio E, Moggio M, Candelise L, Galimberti D, et al. 2009. Inclusion body myopathy and frontotemporal dementia caused by a novel VCP mutation. *Neurobiology of aging*. May;30:752-758. Epub 2007/09/25.

Bird T, Knopman D, VanSwieten J, Rosso S, Feldman H, Tanabe H, Graff-Raford N, Geschwind D, Verpillat P, Hutton M. 2003. Epidemiology and genetics of frontotemporal dementia/Pick's disease. *Annals of neurology*.54 Suppl 5:S29-31.

Broccolini A, Gidaro T, Morosetti R, Sancricca C, Mirabella M. 2011. Hereditary inclusion-body myopathy with sparing of the quadriceps: the many tiles of an incomplete puzzle. *Acta*

myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases. Oct;30:91-95.

Brunger AT, DeLaBarre B. 2003. NSF and p97/VCP: similar at first, different at last. FEBS letters. Nov 27;555:126-133.

Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. 1990. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. Nature. Apr 5;344:540-541.

Chen S, Sayana P, Zhang X, Le W. 2013. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. Molecular neurodegeneration. Aug 13;8:28.

Chernyatina AA, Nicolet S, Aebi U, Herrmann H, Strelkov SV. 2012. Atomic structure of the vimentin central alpha-helical domain and its implications for intermediate filament assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Aug 21;109:13620-13625.

Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C. 1994. Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. Cell. Nov 18;79:679-694. Epub 1994/11/18.

Confalonieri F, Duguet M. 1995. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. Jul;17:639-650. Epub 1995/07/01.

Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin JJ, et al. 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. Nature. Aug 24;442:920-924.

D'Amico A, Fattori F, Bellacchio E, Catteruccia M, Servidei S, Bertini E. 2013. A new de novo missense mutation in MYH2 expands clinical and genetic findings in hereditary myosin myopathies. Neuromuscular disorders : NMD. May;23:437-440.

D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. 2011. Spinal muscular atrophy. Orphanet journal of rare diseases.6:71.

Dai RM, Chen E, Longo DL, Gorbea CM, Li CC. 1998. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. The Journal of biological chemistry. Feb 6;273:3562-3573.

Dai RM, Li CC. 2001. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. Nature cell biology. Aug;3:740-744.

Dalakas MC. 2006. Sporadic inclusion body myositis--diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. Nature clinical practice Neurology. Aug;2:437-447.

- Dalakas MC, Dagvadorj A, Goudeau B, Park KY, Takeda K, Simon-Casteras M, Vasconcelos O, Sambuughin N, Shatunov A, Nagle JW, et al. 2003. Progressive skeletal myopathy, a phenotypic variant of desmin myopathy associated with desmin mutations. *Neuromuscular disorders : NMD*. Mar;13:252-258.
- Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG. 2000. Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *The New England journal of medicine*. Mar 16;342:770-780.
- Darin N, Kyllerman M, Wahlstrom J, Martinsson T, Oldfors A. 1998. Autosomal dominant myopathy with congenital joint contractures, ophthalmoplegia, and rimmed vacuoles. *Annals of neurology*. Aug;44:242-248.
- Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, Olender T, Barash M, Shemesh M, Sadeh M, Grabov-Nardini G, et al. 2001. The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nature genetics*. Sep;29:83-87.
- Farpour F, Tehranzadeh J, Donkervoort S, Smith C, Martin B, Vanjara P, Osann K, Kimonis VE. 2012. Radiological features of Paget disease of bone associated with VCP myopathy. *Skeletal radiology*. Mar;41:329-337.
- Ferrari S, Cannizzaro LA, Battini R, Huebner K, Baserga R. 1987. The gene encoding human vimentin is located on the short arm of chromosome 10. *American journal of human genetics*. Oct;41:616-626.
- Ferrer I, Olive M. 2008. Molecular pathology of myofibrillar myopathies. *Expert reviews in molecular medicine*. 10:e25.
- Fischer D, Walter MC, Kesper K, Petersen JA, Aurino S, Nigro V, Kubisch C, Meindl T, Lochmuller H, Wilhelm K, et al. 2005. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *Journal of neurology*. May;252:538-547.
- Fisher J, Upadhyaya M. 1997. Molecular genetics of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Neuromuscular disorders : NMD*. Jan;7:55-62.
- Forman MS, Mackenzie IR, Cairns NJ, Swanson E, Boyer PJ, Drachman DA, Jhaveri BS, Karlawish JH, Pestronk A, Smith TW, et al. 2006. Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Jun;65:571-581. Epub 2006/06/20.
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM. 2004. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature medicine*. Oct;10:1055-1063.
- Franz A, Ackermann L, Hoppe T. 2013. Create and preserve: Proteostasis in development and aging is governed by Cdc48/p97/VCP. *Biochimica et biophysica acta*. Apr 10.
- Furst DO, Osborn M, Weber K. 1989. Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *The Journal of cell biology*. Aug;109:517-527.

- Gilchrist JM, Pericak-Vance M, Silverman L, Roses AD. 1988. Clinical and genetic investigation in autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology*. Jan;38:5-9.
- Goldfarb LG, Park KY, Cervenakova L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC. 1998. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nature genetics*. Aug;19:402-403.
- Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC. 2004. Desmin myopathy. *Brain : a journal of neurology*. Apr;127:723-734.
- Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, Rowland LP. 1995. Inclusion body myositis and myopathies. *Annals of neurology*. Nov;38:705-713.
- Guglieri M, Bushby K. 2008. How to go about diagnosing and managing the limb-girdle muscular dystrophies. *Neurology India*. Jul-Sep;56:271-280.
- Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmuller H. 2008. Limb-girdle muscular dystrophies. *Current opinion in neurology*. Oct;21:576-584.
- Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Duyckaerts C, Dumanchin C, Bou J, Dugny F, Le Ber I, Frebourg T, Hannequin D, Campion D. 2006. Valosin-containing protein gene mutations: clinical and neuropathologic features. *Neurology*. Aug 22;67:644-651. Epub 2006/06/23.
- Halawani D, Latterich M. 2006. p97: The cell's molecular purgatory? *Molecular cell*. Jun 23;22:713-717. Epub 2006/06/24.
- Haubenberger D, Bittner RE, Rauch-Shorny S, Zimprich F, Mannhalter C, Wagner L, Mineva I, Vass K, Auff E, Zimprich A. 2005. Inclusion body myopathy and Paget disease is linked to a novel mutation in the VCP gene. *Neurology*. Oct 25;65:1304-1305. Epub 2005/10/26.
- Hauser MA, Conde CB, Kowaljow V, Zeppa G, Taratuto AL, Torian UM, Vance J, Pericak-Vance MA, Speer MC, Rosa AL. 2002. myotilin Mutation found in second pedigree with LGMD1A. *American journal of human genetics*. Dec;71:1428-1432.
- Hauser MA, Horrigan SK, Salmikangas P, Torian UM, Viles KD, Dancel R, Tim RW, Taivainen A, Bartoloni L, Gilchrist JM, et al. 2000. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Human molecular genetics*. Sep 1;9:2141-2147.
- Hodges JR, Davies RR, Xuereb JH, Casey B, Broe M, Bak TH, Kril JJ, Halliday GM. 2004. Clinicopathological correlates in frontotemporal dementia. *Annals of neurology*. Sep;56:399-406.
- Hubbers CU, Clemen CS, Kesper K, Boddreich A, Hofmann A, Kamarainen O, Tolksdorf K, Stumpf M, Reichelt J, Roth U, et al. 2007. Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain : a journal of neurology*. Feb;130:381-393. Epub 2006/09/21.
- Huizing M, Krasnewich DM. 2009. Hereditary inclusion body myopathy: a decade of progress. *Biochimica et biophysica acta*. Sep;1792:881-887.

- Janiesch PC, Kim J, Mouysset J, Barikbin R, Lochmuller H, Cassata G, Krause S, Hoppe T. 2007. The ubiquitin-selective chaperone CDC-48/p97 links myosin assembly to human myopathy. *Nature cell biology*. Apr;9:379-390.
- Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, Sommer T. 2002. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nature cell biology*. Feb;4:134-139. Epub 2002/01/29.
- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J, et al. 2010. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*. Dec 9;68:857-864.
- Jones S. 2012. Computational and structural characterisation of protein associations. *Advances in experimental medicine and biology*. 747:42-54.
- Ju JS, Miller SE, Hanson PI, Weihl CC. 2008. Impaired protein aggregate handling and clearance underlie the pathogenesis of p97/VCP-associated disease. *The Journal of biological chemistry*. Oct 31;283:30289-30299.
- Ju JS, Weihl CC. 2010. Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia: a disorder of autophagy. *Human molecular genetics*. Apr 15;19:R38-45. Epub 2010/04/23.
- Kimonis VE, Fulchiero E, Vesa J, Watts G. 2008. VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder. *Biochimica et biophysica acta*. Dec;1782:744-748. Epub 2008/10/11.
- Kimonis VE, Kovach MJ, Waggoner B, Leal S, Salam A, Rimer L, Davis K, Khardori R, Gelber D. 2000. Clinical and molecular studies in a unique family with autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and Paget disease of bone. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. Jul-Aug;2:232-241. Epub 2001/03/17.
- Kimonis VE, Mehta SG, Fulchiero EC, Thomasova D, Pasquali M, Boycott K, Neilan EG, Kartashov A, Forman MS, Tucker S, et al. 2008. Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *American journal of medical genetics Part A*. Mar 15;146A:745-757. Epub 2008/02/09.
- Klein RM, Norman A. 1995. Diagnostic procedures for Paget's disease. Radiologic, pathologic, and laboratory testing. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. Jun;24:437-450.
- Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, Kakizuka A. 2002. Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*. Dec 6;277:47358-47365.
- Kondo H, Rabouille C, Newman R, Levine TP, Pappin D, Freemont P, Warren G. 1997. p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature*. Jul 3;388:75-78. Epub 1997/07/03.

- Kovach MJ, Waggoner B, Leal SM, Gelber D, Khardori R, Levenstien MA, Shanks CA, Gregg G, Al-Lozi MT, Miller T, et al. 2001. Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3-p12 of a unique dominant disorder in four families: hereditary inclusion body myopathy, Paget disease of bone, and frontotemporal dementia. *Molecular genetics and metabolism*. Dec;74:458-475. Epub 2001/12/26.
- Lamar KM, McNally EM 2014. Genetic Modifiers for Neuromuscular Diseases. *Journal of Neuromuscular Diseases*. May;1:3-13.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. Jan 13;80:155-165.
- Lipton AM, White CL, 3rd, Bigio EH. 2004. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease-type inclusions predominates in 76 cases of frontotemporal degeneration. *Acta neuropathologica*. Nov;108:379-385.
- Mackenzie IR, Feldman HH. 2005. Ubiquitin immunohistochemistry suggests classic motor neuron disease, motor neuron disease with dementia, and frontotemporal dementia of the motor neuron disease type represent a clinicopathologic spectrum. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Aug;64:730-739.
- Meyer H, Bug M, Bremer S. 2012. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature cell biology*. Feb;14:117-123.
- Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, Warren G. 2000. A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *The EMBO journal*. May 15;19:2181-2192. Epub 2000/05/16.
- Mills BG, Singer FR. 1976. Nuclear inclusions in Paget's disease of bone. *Science*. Oct 8;194:201-202.
- Mor-Vaknin N, Punturieri A, Sitwala K, Markovitz DM. 2003. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nature cell biology*. Jan;5:59-63.
- Muller M, Bhattacharya SS, Moore T, Prescott Q, Wedig T, Herrmann H, Magin TM. 2009. Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Human molecular genetics*. Mar 15;18:1052-1057.
- Mullis KB. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique*. 48:579-582.
- Nalbandian A, Donkervoort S, Dec E, Badadani M, Katheria V, Rana P, Nguyen C, Mukherjee J, Caiozzo V, Martin B, et al. 2011. The multiple faces of valosin-containing protein-associated diseases: inclusion body myopathy with Paget's disease of bone, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of molecular neuroscience : MN*. Nov;45:522-531. Epub 2011/09/06.
- Neumann M, Mackenzie IR, Cairns NJ, Boyer PJ, Markesbery WR, Smith CD, Taylor JP, Kretzschmar HA, Kimonis VE, Forman MS. 2007. TDP-43 in the ubiquitin pathology of

frontotemporal dementia with VCP gene mutations. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. Feb;66:152-157. Epub 2007/02/07.

Nishino I. 2003. Autophagic vacuolar myopathies. *Current neurology and neuroscience reports*. Jan;3:64-69.

Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, Mora M, Riggs JE, Oh SJ, Koga Y, et al. 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*. Aug 24;406:906-910.

Okamoto K, Hirai S, Yamazaki T, Sun XY, Nakazato Y. 1991. New ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the extra-motor cortices in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*. Aug 19;129:233-236.

Olive M, Goldfarb LG, Shatunov A, Fischer D, Ferrer I. 2005. Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain : a journal of neurology*. Oct;128:2315-2326.
Pegoraro E, Hoffman EP. 1993. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview. In: *GeneReviews*. Seattle (WA).

Raben N, Wong A, Ralston E, Myerowitz R. 2012. Autophagy and mitochondria in Pompe disease: nothing is so new as what has long been forgotten. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. Feb 15;160C:13-21.

Rabinovich E, Kerem A, Frohlich KU, Diamant N, Bar-Nun S. 2002. AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Molecular and cellular biology*. Jan;22:626-634. Epub 2002/01/05.

Rabouille C, Kondo H, Newman R, Hui N, Freemont P, Warren G. 1998. Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro. *Cell*. Mar 6;92:603-610. Epub 1998/03/20.

Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR. 2012. Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nature reviews Neurology*. Aug;8:423-434.

Reilich P, Krause S, Schramm N, Klutzny U, Bulst S, Zehetmayer B, Schneiderat P, Walter MC, Schoser B, Lochmuller H. 2011. A novel mutation in the myotilin gene (MYOT) causes a severe form of limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A). *Journal of neurology*. Aug;258:1437-1444.

Romeo V. 2012. Myotonic Dystrophy Type 1 or Steinert's disease. *Advances in experimental medicine and biology*. 724:239-257.

Rubinsztein DC. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature*. Oct 19;443:780-786.

Salmikangas P, Mykkanen OM, Gronholm M, Heiska L, Kere J, Carpen O. 1999. Myotilin, a novel sarcomeric protein with two Ig-like domains, is encoded by a candidate gene for limb-girdle muscular dystrophy. *Human molecular genetics*. Jul;8:1329-1336.

Salmikangas P, van der Ven PF, Lalowski M, Taivainen A, Zhao F, Suila H, Schroder R, Lappalainen P, Furst DO, Carpen O. 2003. Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A

- (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Human molecular genetics*. Jan 15;12:189-203.
- Schroder R, Goudeau B, Simon MC, Fischer D, Eggermann T, Clemen CS, Li Z, Reimann J, Xue Z, Rudnik-Schoneborn S, et al. 2003. On noxious desmin: functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria. *Human molecular genetics*. Mar 15;12:657-669.
- Schroder R, Schoser B. 2009. Myofibrillar myopathies: a clinical and myopathological guide. *Brain pathology*. Jul;19:483-492.
- Selcen D, Ohno K, Engel AG. 2004. Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain : a journal of neurology*. Feb;127:439-451.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic acids research*. Jan 1;29:308-311.
- Siddique T, Deng HX. 1996. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics*. 5 Spec No:1465-1470.
- Siris E, Weinstein RS, Altman R, Conte JM, Favus M, Lombardi A, Lyles K, McIlwain H, Murphy WA, Jr., Reda C, et al. 1996. Comparative study of alendronate versus etidronate for the treatment of Paget's disease of bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Mar;81:961-967.
- van der Ven PF, Wiesner S, Salmikangas P, Auerbach D, Himmel M, Kempa S, Hayess K, Pacholsky D, Taivainen A, Schroder R, et al. 2000. Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *The Journal of cell biology*. Oct 16;151:235-248.
- van der Zee J, Pirici D, Van Langenhove T, Engelborghs S, Vandenberghe R, Hoffmann M, Pusswald G, Van den Broeck M, Peeters K, Mattheijssens M, et al. 2009. Clinical heterogeneity in 3 unrelated families linked to VCP p.Arg159His. *Neurology*. Aug 25;73:626-632.
- van Spaendonck-Zwarts KY, van Hessem L, Jongbloed JD, de Walle HE, Capetanaki Y, van der Kooi AJ, van Langen IM, van den Berg MP, van Tintelen JP. 2011. Desmin-related myopathy. *Clinical genetics*. Oct;80:354-366.
- Viassolo V, Previtali SC, Schiatti E, Magnani G, Minetti C, Zara F, Grasso M, Dagna-Bicarelli F, Di Maria E. 2008. Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia: recurrence of the VCP R155H mutation in an Italian family and implications for genetic counselling. *Clinical genetics*. Jul;74:54-60.
- Waggoner B, Kovach MJ, Winkelman M, Cai D, Khardori R, Gelber D, Kimonis VE. 2002. Heterogeneity in familial dominant Paget disease of bone and muscular dystrophy. *American journal of medical genetics*. Mar 15;108:187-191. Epub 2002/03/14.
- Wang Q, Song C, Li CC. 2004. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *Journal of structural biology*. Apr-May;146:44-57. Epub 2004/03/24.

Warraich ST, Yang S, Nicholson GA, Blair IP. 2010. TDP-43: a DNA and RNA binding protein with roles in neurodegenerative diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Oct;42:1606-1609.

Watts GD, Thomasova D, Ramdeen SK, Fulchiero EC, Mehta SG, Drachman DA, Weihl CC, Jamrozik Z, Kwiecinski H, Kaminska A, et al. 2007. Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Clinical genetics*. Nov;72:420-426. Epub 2007/10/16.

Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP, Kimonis VE. 2004. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature genetics*. Apr;36:377-381. Epub 2004/03/23.

Weihl CC, Miller SE, Hanson PI, Pestronk A. 2007. Transgenic expression of inclusion body myopathy associated mutant p97/VCP causes weakness and ubiquitinated protein inclusions in mice. *Human molecular genetics*. Apr 15;16:919-928.

Weihl CC, Pestronk A, Kimonis VE. 2009. Valosin-containing protein disease: inclusion body myopathy with Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia. *Neuromuscular disorders : NMD*. May;19:308-315. Epub 2009/04/22.

Weihl CC, Temiz P, Miller SE, Watts G, Smith C, Forman M, Hanson PI, Kimonis V, Pestronk A. 2008. TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. Oct;79:1186-1189. Epub 2008/09/18.

Wojcik C, Yano M, DeMartino GN. 2004. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *Journal of cell science*. Jan 15;117:281-292.

Yamaoka LH, Westbrook CA, Speer MC, Gilchrist JM, Jabs EW, Schweins EG, Stajich JM, Gaskell PC, Roses AD, Pericak-Vance MA. 1994. Development of a microsatellite genetic map spanning 5q31-q33 and subsequent placement of the LGMD1A locus between D5S178 and IL9. *Neuromuscular disorders : NMD*. Sep-Nov;4:471-475.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. med. Marianne Dieterich möchte ich für die Möglichkeit danken, die Dissertation an der Neurologischen Klinik und Poliklinik durchzuführen und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Friedrich-Baur-Institut.

Frau Prof. Dr. med. Maggie C. Walter danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und das rege Interesse an dem Fortschreiten der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil. Sabine Krause für die Etablierung des Promotionsthemas, die intensive Betreuung der Arbeit, ihre Geduld, die unermüdliche Unterstützung im Labor bei technischen und inhaltlichen Fragen und die kritische Durchsicht der Dissertation.

Auch allen Mitarbeitern im Labor für Molekulare Myologie des Friedrich-Baur-Instituts möchte ich herzlich danken. Das Arbeitsklima und die kollegiale Unterstützung waren wirklich außergewöhnlich. Besonders möchte ich hier Herrn Dr. Rolf Stucka, Frau Dipl.-Ing. Christiana Kubny, Frau Marina Dusl, MSc., Frau Anja Pertl, MSc. und Frau Dr. Cordula Pertl, Frau Constanze Gallenmüller, Frau Dr. Stefanie Bulst und Frau Dr. Dipl.-Biol. Sarah Feldkirchner danken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch noch von ganzem Herzen bei meinen Eltern, Helmut und Dr. Elisabeth Zehetmayer für ihre Liebe und Unterstützung und ihren Glauben an mich bedanken. Ihr habt es mir ermöglicht, meinen Weg zu finden und ihn auch zu gehen. Auch meinen Brüdern Dr. Matthias und Simon Zehetmayer gilt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung und Liebe und den familiären Zusammenhalt.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch aus tiefstem Herzen bei Dr. Bernhard Cordt bedanken. Insbesondere in den letzten Zügen der Arbeit warst Du mir eine besondere Hilfe, Motivation und Inspiration. Unser ungeborenes Kind und die Freude auf unsere Elternschaft haben mir Flügel verliehen.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Reilich, P., Krause, S., Schramm, N., Klutzny, U., Bulst, S., Zehetmayer, B., Schneiderat, P., Walter, M. C., Schoser, B., Lochmüller, H. (2011) **A novel mutation in the myotilin gene (MYOT) causes a severe form of limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A).** J Neurol. 258(8):1437-44.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Molekulargenetische Analyse der Kandidatengene *p97/VCP*, Myotilin und Vimentin bei hereditären Myopathien

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner anderen Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 12.8.2014

Barbara Doris Zehetmayer